

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2056.

GÖRÖG ANNA

Bőrgyógyászat és venerológia
című program

Programvezető: Dr. Sárdy Miklós, egyetemi docens

Témavezető: Dr. Kárpáti Sarolta, egyetemi tanár

Új megfigyelések a dermatitis herpetiformis patomechanizmusában

Doktori értekezés

Dr. Görög Anna

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kárpáti Sarolta, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szalai Zsuzsanna Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Mihály Emese, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Domján Gyula Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina Ph.D., egyetemi tanár

Dr. Kinyó Ágnes Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	7
2.1. A transzglutamináz enzimesalád általános ismertetése.....	7
2.1.1. TG1 (keratinocyta transzglutamináz).....	11
2.1.2. TG2 (szöveti transzglutamináz).....	12
2.1.3. TG3 (epidermális transzglutamináz).....	13
2.1.4. TG4 (prosztata transzglutamináz).....	14
2.1.5. TG5 (TG _x).....	14
2.1.6. TG6 (TG _y).....	15
2.1.7. TG7 (TG _z).....	16
2.1.8. FXIII-A (Laki-Lóránd faktor, fibrin-stabilizáló faktor, plazma transzglutamináz	16
2.1.9. 4.2 protein.....	17
2.2. Dermatitis herpetiformis.....	19
2.2.1. A DH klinikai megjelenése.....	19
2.2.2. Epidemiológia.....	20
2.2.3. A DH patomechanizmusa.....	22
2.2.3.1. Genetikai háttér.....	22
2.2.3.2. A glutén szerepe.....	23
2.2.3.3. A GSE patomechanizmusának rövid áttekintése.....	24
2.2.3.4. Ellenanyagok glutén szenzitív enteropathiában.....	25
2.2.3.5. A TG3 szerepe a DH kialakulásában.....	26
2.2.4. A DH diagnosztikája.....	29
2.2.5. A DH terápiája.....	31
2.2.5.1. Gluténmentes diéta.....	31
2.2.5.2. Dapsone terápia	32
2.2.6. Az immunkomplex elmélet háttere DH-ban.....	33
2.2.7. A fibrinogén-fibrin-fibrinolízis patológia DH-ban.....	34
3. Célkitűzések.....	37
4. Módszerek.....	38

4.1. A DH diagnosztikája.....	38
4.1.1. Szövettani vizsgálat.....	38
4.1.2. Direkt immunfluoreszcens vizsgálat.....	38
4.1.3. EMA, anti-TG2-IgA ELISA.....	38
4.1.4. Anti-TG3 IgA ELISA.....	38
4.2. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat.....	39
4.2.1. Betegek és módszer.....	39
4.2.2. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA.....	42
4.2.3. Statisztikai elemzés.....	42
4.3. A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata.....	43
4.3.1. Betegek és módszer.....	43
4.3.2. A t-PA katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása.....	45
4.3.3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat.....	46
4.3.3.1. A fibrinháló szerkezeti vizsgálata.....	47
4.3.3.2. Statisztikai elemzés.....	47
4.4. Etikai vonatkozások.....	47
5. Eredmények.....	48
5.1. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat.....	48
5.2. A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata.....	52
5.2.1. A t-PA katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása.....	52
5.2.2. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat.....	58
6. Megbeszélés.....	62
6.1. Keringő TG3-IgA immunkomplexek dermatitis herpetiformisban.....	62
6.2. Fibrinolitikus potenciál és a fibrin szerkezeti vizsgálata.....	67
7. Következtetések.....	71
8. Összefoglalás.....	72
9. Summary.....	73
10. Irodalomjegyzék.....	74
11. Saját publikációk jegyzéke.....	106
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	106

11.2. A disszertációtól független közlemények.....	106
12. Köszönetnyilvánítás.....	107

1. Rövidítések jegyzéke

A	abszorbancia
ARCI	autoszómális recesszív congenitalis ichthyosis
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
AU	arbitrary unit
BSA	bovine serum albumin
C3	komplement 3
CD	coeliákia (coeliac disease)
CE	cornified envelope
CF	cryofibrinogén
CG	cryoglobulin
DGP	deaminált gliadin peptid
DH	dermatitis herpetiformis
DIF	direkt immunfluoreszcens
ECM	extracelluláris mátrix
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	endomysium antitest
FXIII	faktor XIII
F13A1	FXIII-A génje
FFI	férfi
FITC	fluoreszcein-isotiocianát
GMD	gluténmentes diéta
GSE	glutén szenzitív enteropathia
GTP	guanozin-5'-trifoszfát
HEPES	hidroxietil-piperzeinetán-szulfonsav
HLA	humán leukocyta antigén
IDDM	inzulin dependens diabetes mellitus
IG	immunglobulin
IEL	intraepithelialis lymphocyta
IQR	interquartile range
LINE-1	long interspersed nucleotide element

MHC	major histocompatibility complex
MODY	maturity-onset diabetes of the young
NCGS	non-celiac gluten sensitivity
OMIM	online mendelian inheritance in man
PBS	phosphate-buffered saline
PDF	probability density function
PV	pemphigus vulgaris
RES	reticuloendothelial system
SE	Semmelweis Egyetem
SEM	szkenning elektronmikroszkóp
TG	transzglutamináz
TG1	transzglutamináz 1 (keratinocita transzglutamináz)
TG2	transzglutamináz 2 (szöveti transzglutamináz)
TG3	transzglutamináz 3 (epidermális transzglutamináz)
TGM	transzglutamináz gén
TMB	tetramethylbenzidine
tPA	szöveti plazminogén aktivátor

2. Bevezetés

Több, mint százharminc év telt el azóta, hogy Louis Adolphus Duhring (University of Pennsylvania, Philadelphia, Egyesült Államok) dermatitis herpetiformis (DH) néven, valószínűleg egyéb hólyagos betegségeket is beleértve, leírta a dermatitis herpetiformist.¹ Azt, hogy eltér a klasszikus bullosisoktól (valódi hólyag ritkán látható), később Louis-Anne-Jean Brocq (Hôpital Sant-Louis, Párizs, Franciaország) figyelte meg, ezért Duhring-Brocq, vagy Brocq–Duhring kórképnek is nevezik.² A DH tényleges verifikációja és diagnózisa az immunfluoreszcens diagnosztikai sajátságok kimutatásától számítható (Van der Meer, 1969).³ Köszönhetően az intenzív kutatásoknak, ma már tudjuk, hogy a DH egy glutén indukálta, ún. glutén szenzitív bőrbetegség. Bár a kórkép patomechanizmusát évtizedek óta kutatják, jelenleg sem ismert pontosan. Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb figyelem fordult a glutén szenzitív megbetegedések felé. A diagnosztizált esetek száma, köszönhetően az immunszerológia rohamos fejlődésének, jelentősen nőtt. Az egyre kifinomultabbá váló, korszerű szerológiai vizsgálatok hatékony segítséget nyújtanak a diagnosztikában és a terápiás hatékonyság ellenőrzésében egyaránt.

A bevezetésben a DH klinikumát, patogenezisét, a patogenezisben központi szerepet játszó transzglutamináz enzimcsaládot ismertetem, és részletesebben kitérek a DH autoantigénjére, a transzglutamináz 3-ra (TG3), amit 2002-ben a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika kutatócsoportja - nemzetközi kollaborációban - azonosított.

Munkacsoportunk célul tűzte ki a DH patomechanizmusának további vizsgálatát. A dolgozatban a keringő TG3 – immunglobulin A (IgA) immunkomplex vizsgálatok, valamint a fibrinolitikus potenciál és fibrinszerkezet vizsgálata során kapott eredményeinket ismertetem.

2.1. A transzglutamináz enzimcsalád általános ismertetése

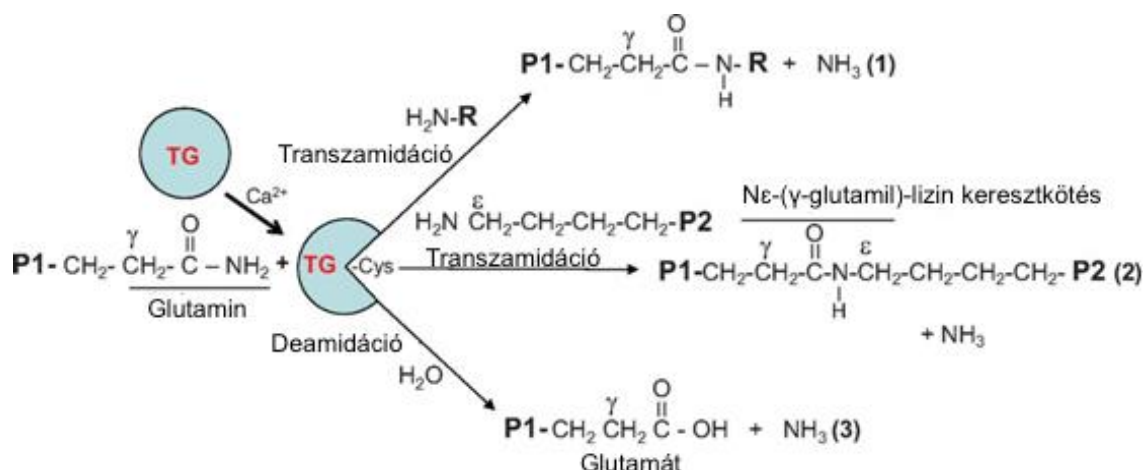
Az emberi szervezetben eddig kilenc transzglutaminázt (TG) azonosítottak, ebből nyolc kódol aktív enzimet (faktor XIII-A, TG1-7), a család kilencedik tagja egy

struktúrfehérje, mely nem rendelkezik enzimatis aktivitással, a vörösvérsejtek membránjának felépítésében van szerepe (erythrocyta 4.2 sávféherje, 4.2 protein) (**1. táblázat**).⁴ Az első enzimet, mely a mai TG2-nek felel meg, Sarkar és munkatársai azonosították 1957-ben⁵, az enzimatis aktivitás alapjait később Folk és Cole publikálták.⁶

A transzglutaminázok fehérjék poszttranszlációs módosítását katalizálják. A legismertebb poszttranszlációs lépés a transzamidáció/deamidáció, mely során az enzimek a fehérjék, vagy polipeptidek lizin és glutamin oldalláncai között N^ε-(γ-glutamil)-lizin izopeptid oldalkötéseket hoznak létre, ami a kovalens keresztkötéseknek köszönhetően rendkívül ellenálló a különböző proteolitikus hatásokkal szemben. A folyamat során ammónia szabadul fel, amikor a glutamin amid csoportja lehasad (**1. ábra**).⁷ A katalizált reakció irreverzibilis, ezért szigorúan szabályozott. Ez a hatás elengedhetetlen például a megfelelő haemostasis, bőrbarrier és az extracelluláris mátrix (ECM) kialakítása során. Ezzel a mechanizmussal stabilizálja a faktor XIII-A (FXIII-A) a fibrint, valamint a TG2 az ECM-ot. Amennyiben amin donor nincs jelen, deamidációt is végezhetnek, mely során peptidlánchoz kötött glutamát keletkezik, valamint szabad aminocsoportokat is köthetnek (**1. ábra**). Az így keletkezett proteinek neoantigénként autoimmun folyamatokat indíthatnak be, mint például a glutén szenzitív kórkepek esetében.

A transzglutaminázok a transzamidáció/deamidáció mellett kináz, diszulfid izomeráz, GTP/ATPáz, izopeptidáz aktivitással is rendelkezhetnek, valamint észterifikációt és hidrolízist is katalizálhatnak.^{8,9}

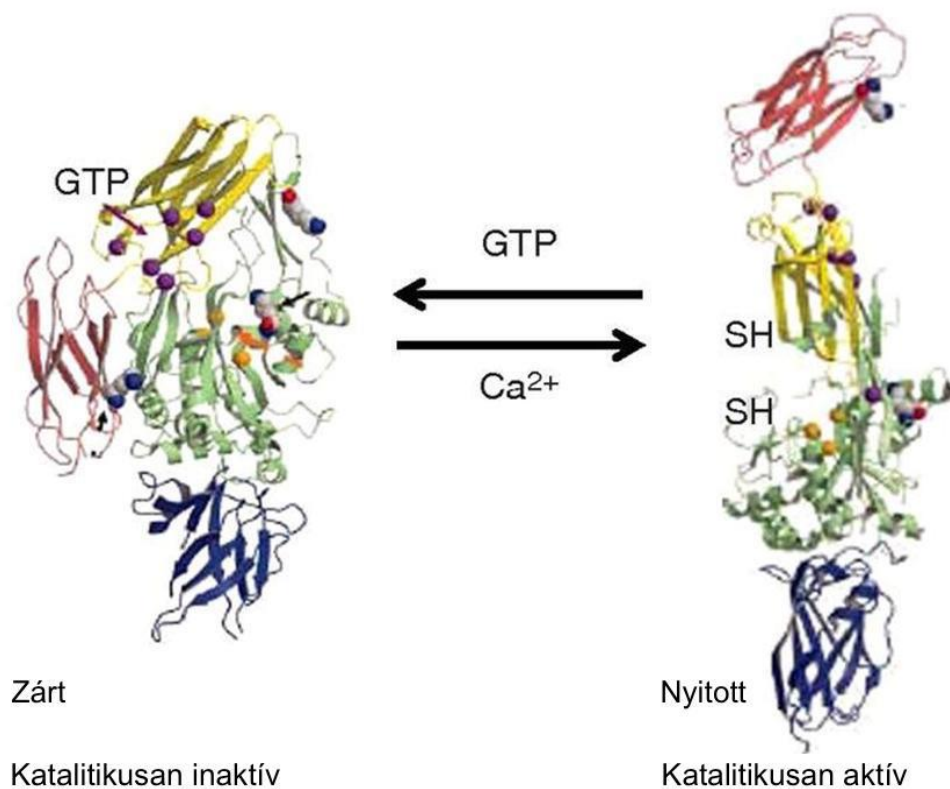
A transzglutaminázok az enzimatis aktivitáson túl G-proteinként is funkcionálnak, GTP-t kötnek és hidrolizálnak, szignáltranszdukciós folyamatokban és a sejt-ECM kölcsönhatásokban is szerepet játszanak. Intracellulárisan és extracellulárisan egyaránt előfordulhatnak, aktivitásuk szigorúan Ca²⁺-függő.⁸



1. ábra A transzglutaminázok katalizálta enzimatis reakciók.⁹ (1) Szabad aminos csoport keresztkötése (2) Protein-protein keresztkötés N^ε-(γ-glutamil)-lizin izopeptid kötésen keresztül (3) Glutamin deamidálása, mely peptidlánhoz kötött glutamát keletkezéséhez vezet.

A TG család tagjait kódoló gének nagyfokú hasonlóságot mutatnak. A TG1 génje (*Tgm1*) és a FXIII-A génje (*F13A1*) 15 exonból és 14 intronból áll, *Tgm2-7* és a 4.2 protein génje (*Ebp4.2*) 13 exonból és 12 intronból áll.^{8, 10}

A humán transzglutaminázok harmadlagos szerkezete, amit a TG2 térszerkezetén keresztül ismertettek, nagymértékben konzervált az enzimcsalád tagjai között (**2. ábra**). Négy domén, egy központi core domén (I.), egy N-terminális β-redő domén (II.) és két C-terminális β-hordó domén képezi szerkezetüket (III., IV.). Az aktív centrumot, mely a core doménen belül helyezkedik el, a cisztein (277.) - hisztidin (335.) – aszparaginsav (358.) aminosavak jellemzik. Nyugalmi helyzetben a centrum rejtett pozíciójú, aktiválásához Ca²⁺ is szükséges. Fiziológias körülmények között a TG2 két formával rendelkezik, a GTP/GDP kötött, transzamidálás szempontjából inaktív, zárt formával és a Ca²⁺-kötött, nyitott, aktív formával (**2. ábra**).⁹



2. ábra. A TG2 inaktív zárt, és aktív nyitott konformációja. A kék az I. központi core domént, a zöld a II. N-terminális β -redő domént, a sárga (III.) és a piros (IV.) a két C-terminális β -hordó domént jelöli.⁹

Az epidermisben a TG1, TG2, TG3 és a TG5 expresszálódik, különböző expressziós mintázatban. A TG1 főként a felső, differenciáltabb rétegekben, a stratum granulosum és a magasabban helyezkedő spinosus sejtekben, a TG2 a bazális sejtsorokban található, míg a TG3 a stratum corneum és az elszarusodó sejtburrok (cornified envelope, CE) területén, de a stratum granulosum felső sejtsoraiban is kimutatható. A TG5 a stratum granulosum és a stratum spinosum területén van jelen.^{11 12 13 14}

A folliculusokban a TG1, TG2, TG3 és a TG5 is expresszálódik, különböző mértékben.^{15 16} A dermisben egyéb transzglutaminázok is jelen lehetnek, például a TG2 és a FXIII-A.

A transzglutaminázoknak döntő szerepe van a jól működő bőrbarrier kialakításában, elsősorban a megfelelő struktúra biztosítása, a CE kialakítása révén. Szerepük jelentős a sebgyógyulás segítésében is. A CE egy ellenálló burok, mely a stratum corneumot alkotó

corneocytákat övezi és köti össze. Lipid/fehérje polimerek alkotják, amelyek között transzglutaminázok katalizálják a keresztkötéseket.¹⁷ Kialakításukban döntő szereppel bír a TG1, a TG3 és a TG5 is, többek között az envoplakin, periplakin, loricrin, ceramidészterek és az egyéb struktúr komponensek kötése révén.¹⁸

2.1.1. TG1 (keratinocita transzglutamináz)

A 90 kDa molekulatömegű fehérje génje (*Tgm1*) a 14q11.2 lokuszon helyezkedik el (**1. táblázat**). Az epidermális differenciáció különböző stádiumában expresszálódik, legkisebb mennyiségben a bazális sejtsorokban, legnagyobb mennyiségben a stratum granulosumban fejeződik ki. A CE, ezáltal a bőrbarrier kialakításában jelentős szerepet játszik, számos CE fehérje keresztkötését végzi (envoplakin, loricrin, periplakin, involucrin).^{19, 20} Többnyire membránhoz kötött formában helyezkedik el, thioészter kötésekön keresztül, mirisztilen és palmiáton keresztül kapcsolódik a belső plazmamembránhoz.²¹⁻²³

Fiziológiás körülmények között az enzimaktivitáshoz a Ca^{2+} mellett a TIG3 (tazarotene-induced gene 3) proteinnel való interakciója is szükséges.²⁴ Az epidermisen kívül a folliculusban a belső gyökérhüvely mindhárom rétegében, valamint a külső gyökérhüvely distalis részén¹⁴, az agyban²⁵, tüdőben²⁶, egerek myocardialis endotheljében is leírták.²⁷ A széleskörű expresszió ellenére a TG1 deficiencia a *Tgm1* mutációja révén elsősorban a bőrt érinti, az autoszomális recesszív congenitalis ichthyosis (ARCI), korábbi nevén lamelláris ichthyosis, ill. congenitalis ichthyosiform erythroderma kialakulásáért felelős.²⁸⁻³⁰

Az ARCI állatmodelljét Jack Russel terrierekben azonosították, mikor a kutyákban spontán mutáció révén a *Tgm1* 9-es intronján belüli LINE-1 transzpozon áthelyeződést írtak le. Sok szempontból modellezi a humán betegséget, nem jár megnövekedett mortalitással és nem befolyásolja az életkilátásokat, fenotípusosan generalizált hyperkeratosis, hisztológiai vizsgálattal vékony CE jellemzi.³¹

Ezzel szemben a *Tgm1* $-/-$ egér a születést követő néhány órán belül elpusztul a nagymértékű transzepidermális vízvesztés, dehidráció miatt. Születéskor sem kollódium, sem ichthyosis nem látható, de a bőr rendkívül erythemas, fénylő, a bőrbarrier jelentős mértékben károsodik.^{32, 33}

2.1.2. TG2 (szöveti transzglutamináz):

A TG2 az enzimes család ubikviter, egyben legjobban ismert tagja, mely számos szövet- és sejtfeleségben expresszálódik, intra-, és extracellulárisan egyaránt előfordul. A 80 kDa tömegű fehérje génje (*Tgm2*) a 20q11-12 kromoszómán található **(1. táblázat)**.³⁴

Az epidermisben a bazális sejtsorokban expresszálódik¹¹, de a terminális anagén folliculusban a belső gyökérhüvelyben is kimutatható.¹⁵

A TG2 zárt formában G-proteinként működik, jelátviteli folyamatokban vesz részt, de az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedésével a GDP szint csökken, a TG2 aktiválódik és keresztköti a sejt fehérjéit.

Intenzív kutatások folynak az enzim funkcióját illetően. Fontos szerepet játszik a sebgyógyulásban, apoptózisban, phagocytosisban, sejt adhézióban, a sejt differenciálódásban, az ECM stabilizálásában és a tumorprogresszióban. Neurodegeneratív kórképekben, úgy mint Huntington-kór, Parkinson-kór és Alzheimer-kór is feltételezik a szerepét, valamint MODY-ban (maturity onset diabetes of the young) a *Tgm2* misszensz mutációját azonosították, de atherosclerosisban, osteoarthritisben, cardialis hypertrophiában, gyulladásos folyamatokban, szöveti remodellingben és a cataracta kialakulásában is szerepet tulajdonítanak a fehérjének. A dolgozat a TG2 élettani és patológiai szerepét nem tárgyalja.

Tgm2 ^{-/-} egér meglepő módon fenotípusosan nem mutat eltérést, azonban - valószínűleg az apoptózisban játszott szerepe miatt - a knockout egerekben az autoimmun kórképek incidenciája magasabb.³⁵ Ezenkívül sebgyógyulásuk lassabb³⁶, valamint a T-sejt proliferáció, macrophag aktiváció és infiltráció kisebb mértékű. Ez a folyamat feltehetően a csökkent NFκB aktiváció eredménye, mely például gyengült kontakt szenzibilizációs válaszhoz vezet.³⁷

A TG2 a coeliákia autoantigénje³⁸, szerepét a glutén szenzitív kórképek kialakulásában a dolgozat későbbi fejezetei tárgyalják.

2.1.3. TG3 (epidermális transzglutamináz):

A TG3 egy 77 kDa molekulatömegű fehérje, egy heterodimer, melyet a 20-as kromoszóma hosszú karján található *Tgm3* gén kódol (20q11-12) (**1. táblázat**). Elsőként tengerimalac szőrtüszőiből izolálták, innen származik a korábbi follikuláris TG elnevezés.³⁹

A TG3 filogenetikailag a TG2-höz áll a legközelebb⁴⁰, jelentős mértékű szekvenciaazonosságot mutatnak, egyes régiókban ez a 64%-ot is eléri.⁴¹ Inaktív zimogén formájában expresszálódik, aktiválódása limitált proteolízise révén jön létre, melyben a chatepsin L és S játszik szerepet.^{42, 43} Az enzimatis aktivitás szabályozásában a TG2-höz hasonlóan a Ca^{2+} és a GTP is szerepet játszik. Három Ca^{2+} ion hatására olyan konformációváltozás jön létre, amely a katalitikus core domaint szabaddá teszi, és így enzimatisan aktívvá válik. A GTP a Ca^{2+} ion kötődését akadályozza, ezáltal gátolja az enzimatis aktivitást.⁴⁴⁻⁴⁶ A hámban a stratum granulosum felső és a stratum corneum alsó részében expresszálódik¹¹, diffúz cytoplazmatikus megoszlást mutat.⁴⁷ Emberi szőrtüszőkben a TG3 a hajszálak cortexében és a cuticulában helyezkedik el, a belső gyökérhüvelyben az expresszió elhanyagolható, itt elsősorban a TG1 és a TG5 jelenléte dominál.¹⁴ Egérben a cortexben, a medullában és a cuticulában is kimutatható⁴⁸, valamint a szőrszálat körülvevő belső gyökérhüvelyben is.⁴⁹ A TG3 az epidermisben a festődési mintázatnak megfelelően a stratum granulosum és spinosum területén aktív egerekben, míg szőrtüszőben elsősorban a medulla és a cortex körül.⁴⁸ Az emberi szervezetben a bőrön kívül eddig csak keratinocytá, vese- és különböző tumorsejtvonalakban azonosították^{11, 16, 50, 51}, illetve a TG3 peptidet a keringésben is kimutatták.⁵²

Egerekben a TG3 a bőrön kívül mRNS szinten az agyban, gyomorban és a hereszövetben mutatható ki legnagyobb mennyiségben, de a vékonybélben, a lépben és az izomszövetben is megtalálható. Fehérje szinten a bőrön kívül a gyomorban és a hereszövetben tudták kimutatni.⁵⁰

A TG3 a TG1 és a TG5 mellett alapvető szerepet játszik a keratinizációban, valamint a CE kialakításában intramolekuláris izopeptid kötések, valamint elsősorban a loricrin, involucrin és egyéb proteinek keresztkötése által.¹⁶ A trychohyalin, keratin asszociált proteinek és keratin intermedier filamentumok keresztkötésével a szőrzet, a haj és a

follicularis epidermis kialakításában játszik szerepet^{14, 16, 48, 53} Egy, a közelmúltban publikált vizsgálat szerint többek között a humán *Tgm3* mutációja is szerepet játszik az “üveggyapot haj”, más néven a “fésülhetelen haj szindróma” kialakításában.⁵⁴

A TG3 különböző epitheliális tumorokban (pl.: oesophagus, fej-nyak tumorok) csökkent, vagy hiányzó expressziót mutat a súlyossággal összefüggésben, ezért azt feltételezik, hogy az emiatt megváltozott epitheliális integritás hozzájárulhat a tumor progresszió kialakulásához.^{51, 55-57} A *Tgm3* knockout egér bajsza és szőre sérülékenyebb, hullámosabb, in vitro a corneocyta fragilitása megnövekedett, de érdekes módon a *Tgm3* *-/-* egérben sebgyógyulási, jelentősebb fejlődési zavart nem tudtak kimutatni.⁵⁸ A Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán Bognár és munkatársai *Tgm3* *-/-* egerekben látens barrier defektust igazoltak, valamint fokozott szenzibilizációs hajlamot, ami szintén alátámasztja a TG3 szerepét a bőrbarrier kialakításában.⁵⁹ Egy hullámos szőrű egértörzs jellegzetes fenotípusának hátterében szintén a *Tgm3* spontán mutációját igazolták.⁵³

A TG3 a dermatitis herpetiformis autoantigénje¹¹, szerepét a DH patogenezisében a dolgozat későbbi fejezetei tárgyalják.

2.1.4. TG4 (prosztata transzglutamináz):

Génje (*Tgm4*) a 3-as kromoszómán található (3p21-22) (**1. táblázat**). A prosztatában és a vesicula seminalis váladékában expresszálódik, extra- és intracellularisan egyaránt leírták. Elsősorban a reprodukcióban, a semen képződésében játszik szerepet. Egyre több adat szól amellett, hogy a prosztata tumorok progresszióját befolyásolja.^{60, 61} Újabban a férfi meddőséggel is kapcsolatba hozzák⁶², az autoimmun polyglandularis szindróma 1-es típusában írták le, mint autoantigén.⁶³ *Tgm4* *-/-* egérmodell esetében a fertilitás jelentősen csökkent.⁶⁴

2.1.5. TG5 (TG_x):

A 81 kDa molekulatömegű fehérje génje a 15q15.2 lokuszon található (**1. táblázat**). Először keratinocytákban azonosították⁶⁵, később a teljes fehérjén kívül három alternatív splice variánst írtak le humán keratinocytákban (delta3, delta 11, delta 3/11).⁶⁶

Az enzim a TG1-hez és a TG3-hoz hasonlóan a CE kialakításában játszik szerepet, elsősorban a loricrin, involucrin és small prolin-rich proteinek (SPRs) keresztkötése révén. Az epidermisben a stratum granulosumban és a stratum spinosumban expresszálódik legnagyobb mennyiségben, kis mennyiségben a bazális sejtsorokban is kimutatható⁶⁶, a stratum granulosumban festődése átfed a TG3-mal. Elsősorban a keratinocita differenciáció korai szakaszaiban mutatható ki.¹² Intracellularisan perinuklearisan, valamint a citoszkeleton különböző alkotóelemeihez, pl. vimentinhez, aktinhoz kötődve fordul elő.⁶⁶ Aktivitásához Ca^{2+} szükséges, az ATP/GTP gátolja a működését.⁶⁷

Psoriasis vulgarisban, lamellaris ichthyosisban és ichthyosis vulgarisban fokozott aktivitást mutat, Darier kórban az expressziója területenként teljesen eltérő lehet, a fehérje hiánya és nagyfokú expressziója egyaránt kimutatható.¹²

Tgm5 mutációk autoszomális recesszív genodermatosist, az ún. „acral peeling skin szindrómát” okozzák^{68, 69}, ami felületes lízishez, a stratum granulosum és stratum corneum szétválásához vezet. Klinikailag folyamatos, fájdalomtalan hámlás jellemzi, ami elsősorban a tenyéren és a talpon jelentkezik.⁷⁰ A folliculusban a belső gyökérhüvely mindhárom rétegében, valamint a külső gyökérhüvely distalis részén expresszálódik. A cortexben és a medullában gyenge expressziót mutat.¹⁴

2.1.6. TG6 (TG γ):

A TG6 fehérje génje a 20q11 lokuszon található **(1. táblázat)**. Elsősorban az agyban, a központi idegrendszerben expresszálódik⁷¹, de tüdőben és herében is kimutatták. A katalitikus aktivitás szabályozásában a Ca^{2+} -nak és GTP-nek elengedhetetlen szerepe van. Két formája ismert, melyek alternatív splicing révén keletkeznek.^{9, 72} TG6 ellenanyagok (IgA és/vagy IgG) a glutén ataxiás betegek 62%-ánál, míg a cöliákiások 45%-ánál fordulnak elő, olyan esetben, ahol nincs neurológiai érintettség.⁷³ A TG6 antitestek a glutén ataxia szenzitív és specifikus markerei, glutén dependensek.⁷⁴ Szerepük nem teljesen tisztázott, motoneuronok működésében, valamint a neurogenesisben feltételezik hatásukat.⁷² TG6 antitestek jelenlétét többek között leírták már glutén neuropátiában⁷³, skizofréniában⁷⁵, cerebrális parézisben⁷⁶, valamint amyotrófiás laterálsclerózisban is.⁷⁷ Egyéb neurológiai kórképeket, mint például

epilepszia, encephalopathia, demencia, myopathia, sclerosis multiplex is összefüggésbe hoztak a glutén szenzitivitással.^{78, 79} A TG6 antitestek patogenitását egér modellen bizonyították⁸⁰, familiáris spinocerebellária ataxia hátterében a *Tgm6* mutációját azonosították.⁸¹

2.1.7. TG7 (TGz):

Az enzimes család legkevésbé ismert tagja, 81 kDa molekulásúlyú fehérje, génje a 15q15.2 lokuszon található **(1. táblázat)**. A közelmúltban újonnan azonosított humán transzglutamináz, mely működése és expressziója még pontosan nem ismert, a TG6-hoz hasonlóan agyban, tüdőben és herében írták le⁹, valamint vesében és thymusban is azonosították.⁸²

2.1.8. FXIII-A (Laki-Lóránd faktor, fibrin-stabilizáló faktor, plazma transzglutamináz):

A FXIII-A leírása és legfontosabb kutatási eredményei két magyar származású biokémikus, Laki Kálmán és Lóránd László nevéhez fűződnek. A FXIII-A extra-, és intracellulárisan is előfordul, a plazmában fibrinogénhez kapcsoltn kering. A véralkadási kaskád utolsó enzime. A zimogén plazma FXIII egy 320 kDa-os glikoprotein tetramer, mely két A és két B alegységből áll. A transzglutamináz funkciójú A alegységek képezik a tetramer enzimatikusan aktív részét, a FXIIIA-t (83 kDa), melynek génje, a *F13A1* a 6p24–25 lokuszon található **(1. táblázat)**. Az enzim funkcióval nem rendelkező hordozó és gátló B alegységet, a FXIII-B-t (80 kDa) a *F13B* kódolja, mely az 1q31-32.1 lokuszra lokalizált. A FXIII-A-t a csontvelői megakaryocyták/thrombocyták termelik, és a FXIII komplex részeként kering, míg a FXIII-B-t a hepatocyták termelik, kb. 50%-a szabad formában található.⁸³ A FXIII-A aktiválásához trombin és Ca^{2+} szükséges, melyek hatására a B alegység leválik, majd a FXIII-A enzimatikusan aktívvá válik. Az aktiváció a fibrin felszínén zajlik, ahol a fibrin a folyamatot 80-100-szorosára gyorsítja. Az aktivált FXIII-A fibrin monomerek γ -láncai között γ -glutamil- ϵ -aminolizin kovalens kötések alakít ki. A haemostasison kívül számos hatását megfigyelték pl. sebgyógyulásban, porc-, csontszintézisben, gyulladásos

folyamatokban, tumorprogresszióban.³⁴ Az autoszomális recesszív FXIII-A deficiencia emberi szervezetben vérzékenységet, sebgyógyulási zavart, habituális abortuszt okoz^{34, 84}, hasonlóan a knockout egérmodellben megfigyelt tünetekhez.³⁴

A FXIII-A intracellularis formája (celluláris FXIII, cFXIII) egy A2 homodimer (cFXIII-A2) megtalálható a megakaryocytákban és a thrombocytákban, és az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedés hatására aktiválódik.^{85, 86} Thrombocyták a cFXIII-on kívül kis mennyiségben TG2-t is tartalmaznak.⁸⁷ A megakaryocytákon és thrombocytákon kívül monocytákban, macrophagokban, chondrocytákban, osteoblastokban, placentában, astrocytákban, szívizomban, illetve ezek prekursor sejtjeiben is termelődik.^{9, 88-91} Egyre több adat szól amellett, hogy intracellularis folyamatokban is szerepet játszik, például az alternatív úton történő macrophag aktiváció markereként is leírták.⁹²

2.1.9. 4.2 protein:

A 72 kDa molekulatömegű fehérje a transzglutamináz család egyetlen tagja, mely nem rendelkezik enzimatis aktivitással, a központi doménben kialakult cisztein-alanin aminosav csere következtében **(1. táblázat)**. A vörösvérsejtekben, csontvelőben, magzati májban és a lépben expresszálódik. A vörösvérsejtek membránjának egyik fő komponense, a membrán stabilitásában, a stabilitás szabályozásában és jelátviteli folyamatokban is szerepet játszik. A 4.2 protein defektusa különböző súlyosságú haemolitikus anaemiát, megváltozott vörösvérsejt morfológiát és iontranszportot okoz.⁹ Az *Ebp4.2* null mutációja (*Ebp4.2* -/-) egérben enyhe hereditær spherocytosist, a vörösvérsejtek megváltozott iontranszportját okozza.⁹³

1. táblázat. A transzglutamináz enzimesalád.^{9, 11, 16, 34-36, 48-51, 54-66, 68, 71-80, 82, 88-93}

Protein (egyéb elnevezés)	Gén/ lokusz/ OMIM	Molekula- tömeg (kDa)	Funkció	Kifejeződés	Patológia
TG1 (keratinocita TG, TGk)	<i>Tgm1</i> / 14q11.2/ 190195	90	CE formálás, epidermális barrier	KIR, epidermis, folliculus	AR lamelláris ichthyosis
TG2 (szöveti TG, TGc)	<i>Tgm2</i> / 20q11.13/ 190196	80	apoptózis, jelátvitel, ECM stabilizálás, sebgyógyulás	ubikviter	coeliákia, MODY
TG3 (epidermális, folliculáris TGc)	<i>Tgm3</i> / 20q11/ 600238	77	CE formálás, epidermális barrier, haj-, szőrfejlődés	epidermis, folliculus, KIR, vese	dermatitis herpetiformis
TG4 (TGp, vesiculase, dorsal prosztata protein)	<i>Tgm4</i> / 3p21.31/ 600585	77	reprodukción, semen képződés	prosztata, vesicula seminalis vadáséka	autoimmun polyglandula- ris szindróma 1-es típusa
TG5 (TGx)	<i>Tgm5</i> / 15q15.2/ 603805	81	CE formálás, epidermális barrier	epidermis, folliculus	acral peeling szindróma
TG6 (TGy)	<i>Tgm6</i> / 20q11/ 613900	78	ismeretlen	KIR, tüdő, here	glutén ataxia, neuropathia
TG7 (TGz)	<i>Tgm7</i> / 15q15.2/ 606776	81	ismeretlen	KIR, tüdő, here, vese, thymus	ismeretlen
FXIII-A (Laki-Lóránd faktor, fibrin stabilizáló faktor, plazma TG)	<i>F13A1</i> / 6p24-25/ 134570	83	haemostasis, sebgyógyulás, porc- és csontképződés, jelátvitel	véralplazma, thrombocyt, chondrocyt, osteoblast, macrophag, placenta,	vérzékenység, sebgyógyulási zavar, habitális abortus
Protein 4.2 (ATP-kötő erythrocyta membrán protein 4.2, B4.2)	<i>Epb4.2</i> / 15q15.2/ 177070	72	sejtdhézió, membrán integritás, jelátvitel (enzimatisusan inaktív)	vörösvérsejt, csontvelő, magzati máj és lép	hereditér spherocytosis, haemolitisus anaemia

2.2. A dermatitis herpetiformis

A dermatitis herpetiformis (DH) egy intenzív viszketéssel járó krónikus hólyagos bőrbetegség. A glutén szenzitív enteropathia (GSE, lisztérzékenység, coeliákia, nem trópusi sprue) extraintestinális megjelenési formája.

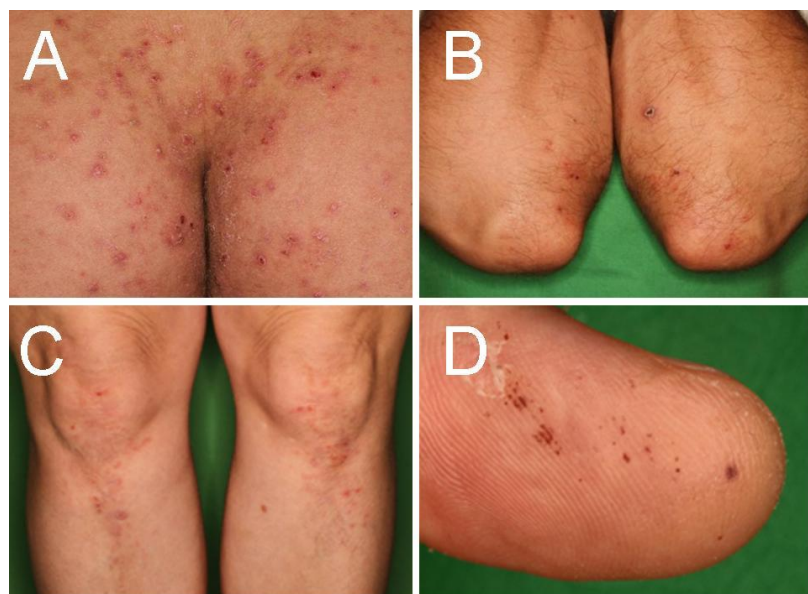
A GSE etiológiája 1953-ig ismeretlen maradt, Dicke és munkatársai fedezték fel a búzában lévő glutén szerepét.⁹⁴ A DH enteropathiával való kapcsolatát Marks, Fry és munkatársai köztették a hatvanas évek második felében.^{95, 96} Később igazolták, hogy a bőrtünetek és az enteropathia is regrediál gluténmentes diéta (GMD) mellett.⁹⁷⁻⁹⁹ Mivel GSE esetében a gasztrointesztinális tünetek domináltak, valamint az endoszkópos és a szövettani vizsgálat során is enteropathia igazolódott, nem meglepő, hogy a coeliákiát sokáig a vékonybél megbetegedésének tartották. Ma már az Európai Gyermekgasztroenterológiai, Hepatológiai és Táplálkozástudományi Társaság (ESPGHAN) legfrissebb ajánlásában a GSE-t szisztémás immunmediált kórképként definiálják.¹⁰⁰ A közelmúltban egy új betegségcsoport, a nem coeliákiás gluténérzékenység (NCGS) jelent meg, melyről egyelőre keveset tudunk. A coeliákiához hasonló tünetekkel jár, de a coeliákia diagnózisa sem szerológiai, sem szövettani vizsgálattal nem állítható fel.¹⁰¹

2.2.1. A DH klinikai megjelenése

Polimorf, intenzív viszketéssel járó, szimmetrikusan elhelyezkedő erythemás maculák, papulák, excoriatiók, urtiariform plakkok, seropapulák, csoportos vesiculák jellemzik, melyek jellegzetes eloszlást mutatnak. Elsősorban a nagy ízületek feszítő felszínein, a könyökök, térdék, valamint a gluteális régió felett és a hát felső részén jelennek meg, de a tünetek disszemináltak is lehetnek. **(3. ábra)**. Bár a tankönyvek a DH-t az autoimmun bullosisok között tárgyalják, klasszikus, nagy hólyagok ritkán láthatók.¹⁰² A betegek egy részénél az ujjbegyeken, tenyereken, talpakon elszórtan 1-2 mm-es, vörös-barna purpurák jelennek meg **(3. ábra)**.¹⁰³⁻¹⁰⁶ Súlyosabb kórformákban a betegek folyamatosan tünetesek, enyhébb esetekben a kórkép hullámzó lefolyást mutathat, rövidebb-hosszabb tünetmentes időszakokkal tarkítva, és ilyenkor a bőrtünetek normál érend mellett is visszafejlődhetnek. Az ilyen spontán remisszió ritka, míg vannak

bőrgyógyászok, akik 10-29 %-os előfordulásról számolnak be.^{107, 108} Az enteropathiára ugyanez nem jellemző, és a nem diétázó betegekben változatlan marad. Tartós, általában hónapokig tartó szigorú GMD mellett a bőrtünetek elmúlnak, normál étrenden (glutén terhelés) újra jelentkeznek. Nyáron a bőrbetegség javulhat, de az évszakra jellemző fokozott izzadás provokálhatja is a tüneteket.¹⁰⁹

A DH leggyakrabban klinikailag tünetmentes, különböző mértékű és kiterjedésű GSE-hez társul, az enteropathiára általában a bőrtünetek hívják fel a figyelmet. A páciensek negyedénél boholyatrophia egyáltalán nem mutatható ki.¹¹⁰



3. ábra. A DH klinikai képe. A gluteális régió (A), a könyökök (B) és a térd (C) felett szimmetrikusan elhelyezkedő csoportos, helyenként excoriált erythemas papulák. Akrális purpurák a hüvelykujjon (D).

2.2.2. Epidemiológia

A DH incidenciájáról és prevalenciájáról eltérő nemzetközi adatok állnak rendelkezésre, az azonban elmondható, hogy csökkenő tendenciát mutat a coeliákiával ellentétben, ahol részben a szerodiagnosztika gyors fejlődésének köszönhetően az elmúlt évtizedekben többszörösére nőtt a diagnosztizált esetek száma. Előfordulását tekintve a különböző etnikai csoportok között jelentős eltérés figyelhető meg, melynek oka a

populációk különböző immunogenetikai háttere és az eltérő táplálkozási szokások, környezeti faktorok.

Európában a coeliákia előfordulása 0,15-2,7% között van.^{111, 112} Egy igazolt coeliákiás esetre 5-7 diagnosztizálatlan juthat az atípusos, hiányzó, vagy enyhe tünetekkel jelentkező kórformák lappangása miatt ("jéghegy" elmélet). A coeliákia incidenciája világszerte növekvő tendenciát mutat, melynek oka ismeretlen, a környezeti faktorok szerepét feltételezik (glutén fogyasztás minőségi és mennyiségi változása, csecsemőtáplálás jellemzői, intestinális infekciók, mikrobiom, stb.).^{113, 114}

A DH egy ritka kórkép, bármikor kialakulhat, csecsemőknél és időseknél egyaránt. Korábban leggyakrabban fiatal felnőtt korban, többnyire a második és a negyedik évtizedben jelentkeztek az első tünetek.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Az elmúlt évtizedekben a betegek átlag életkora a diagnózis időpontjában szignifikánsan nőtt, általában a hatodik évtizedben jelentkeznek a klinikai tünetek.^{110, 118} Férfiakat gyakrabban érinti¹¹⁹, ellentétben a coeliákiával^{120, 121}, és a gyermekkori esetekkel, ahol női dominancia jellemző.¹²²

Magyarországon a DH incidenciáját még nem vizsgálták. A GSE hazai prevalenciáját Korponay-Szabó és munkatársai mérték fel. 3-6 év közötti gyermekeknél (427 fő) 1,2%-os prevalenciát találtak (1:85)¹²³, később nagyobb gyermekpopulációt (2690 fő) vizsgálva hasonló előfordulást igazoltak (1,4%).¹²⁴ 2013-ban Sárdy és munkatársai egészséges véradóknál (4155 fő) a közép-európaihoz hasonló, de a hazai gyermekpopulációnál kisebb, 0,6%-os prevalenciát publikáltak.¹²⁵

A DH Észak-Európában és az Egyesült Államokban, Utah-ban viszonylag gyakori^{119, 126, 127}, Dél-Amerikában is előfordul, de Ázsiában és Afrikában rendkívül ritka, ami mögött valószínűleg az eltérő immunogenetikai háttér és táplálkozási szokások, valamint a HLA-DQ2 hiánya állhat.¹²⁸⁻¹³⁰ Európa déli részein és Magyarországon a DH gyermekkori előfordulása gyakoribb, északon ritkább, Finnországban az összes esetnek mindössze 4%-a.

A DH eddigi legmagasabb incidenciáját (75/100.000 fő) Finnországban írták le, közel 40 év adatai alapján (1970-2009). Figyelemre méltó, hogy ezalatt az időszak alatt 5,2/100.000 fő/év-ről 2,7/100.000 fő/év-re csökkent az incidencia, a teljes vizsgálati időtartamot tekintve 3,5/100.000 fő/év átlaggal, ami nyolcada volt coeliákiás eseteknek. A páciensek életkora a diagnózis időpontjában szignifikánsan nőtt mindkét nemből, férfiaknál 35,3-ról 51,1 évre, míg nők esetében 36,3-ról 45,8 évre. Míg a nyolcvanas

években még szinte megegyezett a DH és a coeliákia előfordulása, ma hatszor kevesebb a DH, mint a GSE.¹¹⁹

Az Egyesült Királyságban a DH incidenciája alacsonyabb volt, mint Finnországban, de a finn vizsgálatához hasonlóan csökkenő tendenciát mutat, 1,8/100.000 fő/év-ről 0,8/100.000 fő/év-re csökkent két évtized alatt, ami évenkénti 4%-os csökkenést jelent. Ezzel párhuzamosan a GSE incidenciája négyszeresére nőtt (10-22,3/100.000 fő/év).¹²⁶ Egy, a közelmúltban publikált retrospektív szerb felmérés szerint 20 év adatait feldolgozva (1991-2010) jelentősen alacsonyabb, 1.42/millió fő/év-es incidenciát találtak DH esetében, mely szintén csökkenő tendenciát mutat.¹³¹

2.2.3. A DH patomechanizmusa

A DH-t a tankönyvek a klasszikus autoimmun bullosisok közé sorolják a dermális papillák csúcsán lerakódó granuláris IgA csapadék miatt, amit 1969-ben van der Meer írt le először Groningen-ben³, és amiről azóta kiderült, hogy kórjelző DH-ban. Kárpáti és munkatársai ultrastrukturálisan vizsgálta az IgA jelenlétét¹³², és megállapították, hogy különböző kötőszöveti struktúrák mentén lerakódó „DH testecskék” találhatók rendszertelen megoszlást mutatva a dermális papillákban. A klasszikus autoimmun bullosisokkal ellentétben a keringő IgA antitestek nem kötődnek a dermis struktúrális elemeihez a direkt IF-nak megfelelő lokalizációban.¹³³ Az oldhatatlan csapadék formájában a papilláris dermisben lerakódott IgA kivonására tett kísérletek sikertelenek maradtak¹³⁴, a dermális IgA antigénje a leírását követően több, mint három évtizedig ismeretlen maradt. Sárdy és munkatársai 2002-ben azonosították a TG3-t, mint a dermális IgA csapadék autoantigénjét¹¹, és elsőként mutatták ki az enzim jelenlétét a bőrben és vérben a TG3 elleni keringő ellenanyagokat is. Ez a megfigyelés közelebb vitt a bőrben lerakódó IgA természetének, a DH patomechanizmusának megértéséhez.

A DH egy multifaktoriális kórkép, kialakulásában genetikai, immunológiai és környezeti tényezők is szerepet játszanak, részben megegyezik a coeliákia patogenezisével.

2.2.3.1. Genetikai háttér

A gluténszenzitivitás genetikai háttere jól definiált, a coeliákia és a DH esetében megegyezik. Az immunogenetikai vizsgálatok fejlődésével a coeliákia és a DH közötti kapcsolat egyre nyilvánvalóbbá vált, ezt mutatja, hogy az elsőfokú rokonok között előfordulásuk 10% körül van (2,3-18,1%).^{123, 135, 136} A páciensek többségénél (90%) HLA-DQ2.5 (DQA1*05, DQB1*02), míg kisebb részükénél (5%) a HLA-DQ2.2 (DQA1*02:01, DQB1*02:02), vagy a HLA-DQ8 (DQA1*03, QB1*03:02) (5%) hordozás jellemző.^{137, 138} A HLA hordozás szükséges, de nem elégséges a GSE kialakulásához, hiánya coeliákia esetén kizáró diagnosztikus kritérium.¹⁰⁰

Magyarországon a HLA DQ2, DQ8 alléleket a lakosság 20-25%-a hordozza¹³⁹, de csak 1-2% esetében alakul ki GSE, ami egyéb környezeti, immunológiai és örökletes (non-HLA gének) tényezők szerepére utal a kórkép kialakulásában.¹⁴⁰

Az egypetűjű ikervizsgálatok legalább 80%-os konkordanciát igazolnak¹⁴¹, ami a genetikai faktorok szerepét hangsúlyozza. Kósnai és munkatársai egy monozigóta ikerpár esetét ismertették, akiknél a pár mindkét tagja coeliákiás volt, de csak az ikerpár egyik tagjánál jelent meg DH.¹⁴²

Finnországban Hervonen és munkatársai hat monozigóta ikerpárnál vizsgálták, hogy a genetikai háttér milyen mértékben befolyásolja a fenotípust. Öt párnál a HLA hordozás egyezett, fenotípusuk mégis különböző volt (3 pár DH-s és coeliákiás, 2 párnál az egyik DH-s és coeliákiás, a másik coeliákiás, míg a hatodik párnál az egyik DH-s, a másik coeliákiás), ami a környezeti faktorok szerepét hangsúlyozza.¹⁴³ A DH tehát egy olyan genetikailag meghatározott kórkép, ahol a családban DH és GSE formájában is megjelenhet a glutén szenzitivitás.

2.2.3.2. A glutén szerepe

A glutén szenzitív kórképek legfontosabb triggere a glutén, más néven siker, mely a búzafélék egyik fehérjéje, gliadin és glutenin keveréke.¹⁴⁴ A glutén alkohololdékony komponense, a gliadin felelős leginkább az immunológiai aktivitásért. A rozsnál a secalin, az árpánál a hordein prolaminfrakciója is hasonló hatású. A mindennapi táplálkozás alapvető komponensét a legtöbben jól tolerálják, de vannak azonban, főként

a kaukázusi populációban (kb. 1-2%), akik idegen antigénként ismerik fel a glutaminban és prolinban gazdag fehérjét. A genetikailag fogékony egyéneknél a glutén intolerancia bármely életkorban kialakulhat.^{113, 145, 146} Esetükben az alapvető gabonafélék kóros adaptív és természetes immunválaszt válthatnak ki, melyek már nem csak a glutén, hanem az azt megkötő TG2 ellen is irányulhatnak, és egy környezeti antigén indukálta, GMD mellett reverzibilis autoimmun kórkép, a coeliákia alakul ki.¹⁴⁷ A TG-ok közötti epitope homológia vezethet egyéb glutén indukálta autoimmun kórkép, mint a DH¹¹⁵, vagy a glutén indukálta neurológiai kórképek, mint glutén ataxia, vagy különböző egyéb neuropathiák kialakulásához.⁷⁸

2.2.3.3. A GSE patomechanizmusának rövid áttekintése

A coeliákia autoantigénje a TG2³⁸, ami a vékonybélben subepithelialisan helyezkedik el a kötőszövetben.¹⁴⁸ A gliadint az intestinális proteázok nem tudják lebontani, a prolinban és glutaminban gazdag fehérje rezisztens az intestinális endopeptidázokkal szemben, ezért akkumulálódik a vékonybélben és az epithelen keresztül a vékonybél lamina propriajának kötőszöveti rétegéhez, az endomysiumhoz transzportálódik. Az abszorpció helyén a TG2 a gliadin szelektív deamidálását katalizálja, deamidált gliadin peptideket köt, és maga a kovalensen kötött TG2 is, mint célantigén, T-sejt mediált adaptív és természetes immunválaszt vált ki. Genetikai fogékonyság esetén az antigénprezentáló sejtek MHC II. molekulán keresztül a TG2-deamidált gliadin komplexekhez kötődnek és prezentálják az adaptív immunrendszernek, így a tolerancia elvesztéséhez, TG2 autoimmunitáshoz, coeliákia kialakulásához vezetnek T-sejt mediált adaptív Th1 válasz, valamint humorális immunválasz, B-sejt aktiváció alakul ki.^{34, 147} A TG2 által kötött deamidált gliadin peptid, és maga az enzim is epitópként szolgál, ami deamidált gliadin specifikus T-sejtek, a TG2 specifikus B-sejtek, deamidált gliadin-TG2 specifikus B-sejt komplexek révén a jellegzetes immunmarkerek kialakításához vezetnek. Gyulladásos citokinek, mátrix metalloproteázok termelődnek, ami a vékonybél mucosa károsodásához, boholyatrofia, kriptahiperplázia kialakulásához vezet.¹⁴⁷

A TG2 antitestek szerepe a GSE patomechanizmusában nem teljesen ismert. Részben gátolják a TG2 transz/deamidációs aktivitását, in vitro a sejtproliferációra hatnak,

proapoptotikus hatásuk van, az angiogenezist és a hámsejtek differenciálódását csökkentik. A coeliákia kialakításában a molekuláris mimikri mechanizmusnak is szerepet tulajdonítanak, mivel kialakulását bakteriális-, illetve vírusinfekciók után is észlelték. A TG2 antitestek egy része keresztreakál saját antigénekkkel (pl. hősokk proteinek, desmoglein 1, toll-like receptor-4).³⁴ Újabban a bélrendszeri mikrobiom megváltozásának is szerepet tulajdonítanak a coeliákia kialakulásában.¹⁴⁹

2.2.3.4. Ellenanyagok gluten szenzitív enteropathiában

A coeliakiát keringő, főként IgA típusú TG2, gliadin, deamidált gliadin peptid elleni valamint a vékonybélhez kötődő TG2 elleni IgA antitestek jellemzik.^{148, 150, 151}

Először az antiretikulin antitestet (ARA) írták le, mint coeliákia specifikus antitestet, amit a különböző szubsztrátok (vese, máj) indirekt immunfluoreszcens festődése alapján nevezték el. Az ARA fagyasztott metszeteken a rácsrostok mintázatát követte.¹⁵² 1983-ban Chorzelski és munkatársai írták le az endomysium ellenanyagot (EMA), amit majom nyelőcsővön, az autoimmun bullosisok diagnosztikájánál alkalmazott szubsztráton mutatott ki. DH-s betegek savójával inkubálva IgA kötődést figyelt meg a simaizom rostok kötőszöveti rétegének (endomysium) megfelelően.¹⁵³ Felismerte, hogy az EMA a GSE specifikus markere, valamint leírta, hogy jelenléte a vérben gluten dependens.¹⁵⁴ A klinikumban mindkét vizsgálat jól alkalmazható volt. Az EMA szenzitívebb (90-100%) és specifikusabb (közel 100%) volt coeliakiában, mint az ARA, melynek oka a különböző szubsztrátjuk volt, humán szöveten a két ellenanyag szenzitivitása és specificitása között nem találtak különbséget.¹⁵⁵ Az IgA típusú humán jejunumhoz kötődő antitestet (JEA) Kárpáti és munkatársai írták le először DH-ban (1988), majd coeliakiában (1990). Tekintve, hogy a JEA a DH-s és a coeliakiás betegek belében kimutatható kóros IgA festődéssel (1988) azonos lokalizációt mutatott, a JEA a GSE autoellenanyagának volt tekinthető.^{150, 156} 1997-ben Dieterich és munkatársai azonosították a TG2-t, mint a coeliákia autoantigénjét³⁸, később a TG2 ellenanyagok kimutatására ELISA módszert fejlesztettek ki.^{157, 158} TG2 knockout egéren coeliakiás és DH-s savókat vizsgálva EMA, ARA és JEA festődést sem lehetett kimutatni, ami bizonyítja, hogy az ellenanyagok megegyeznek, antigénjük a TG2.¹⁵⁹ A deamidált

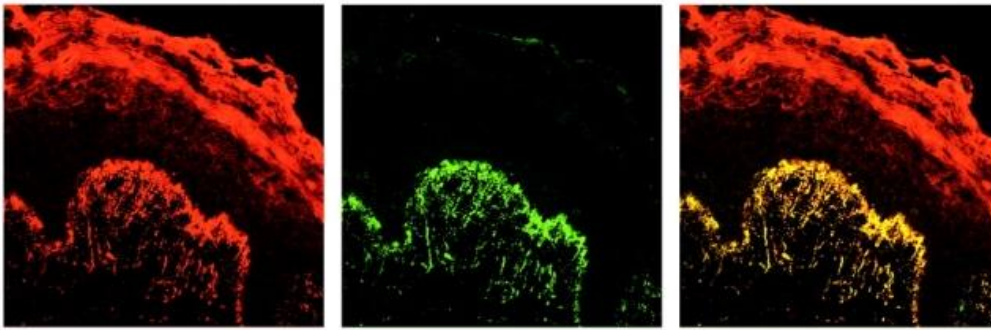
gliadin peptid antitestek szenzitivitás és specificitása coeliákiában kissé alacsonyabb, mint a TG2 elleni antitesteké.¹⁵¹

A vékonybélben a bazálmembrán mentén lerakódó immunoglobulin festődést Dicke és munkatársai írták le először¹³³, később Kárpáti és munkatársai igazolták az intestinális IgA festődés specificitását DH-ban.¹⁵⁶ 2004-ben Korponay-Szabó és munkatársai mutatták ki, hogy az intestinális IgA festődés TG2-specifikus DH-ban és coeliákiában egyaránt.¹⁴⁸ Azóta több kutatócsoport vizsgálta a jellegzetes IgA festődés szenzitivitását és specificitását. Coeliákiában kezeletlen betegeknél szinte 100%-ban kimutatható, míg DH-ban kb. 80%-ban. A vékonybélben lévő TG2-specifikus IgA festődés glutén dependens, szigorú GMD mellett eltűnik, ismételt glutén fogyasztás hatására újra megjelenik.¹⁶⁰

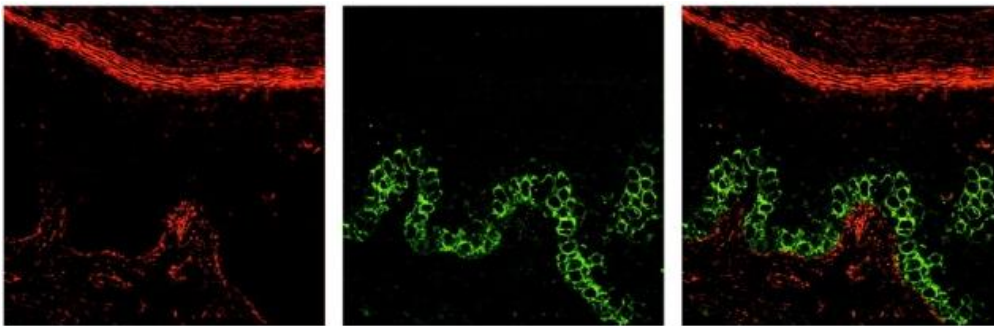
A szerológiai vizsgálat nem csak a differenciáldiagnózisban nyújt segítséget, hanem a nyomonkövetésnél, a diétás együttműködés megítélésénél, valamint a néma-látens formák felismerésénél is nélkülözhetetlen.

2.2.3.5. A TG3 szerepe a dermatitis herpetiformis kialakulásában

Az IgA csapadék antigenitásának vizsgálata nem volt, és jelenleg sem könnyű, hiszen oldhatatlan csapadék formájában van jelen a dermisben. A kioldása csak részben volt sikeres, úgy tűnik, hogy önmagával, illetve egyéb proteinekkel irreverzibilis csapadékot képez.¹⁶¹ 2002-ben Sárdy és munkatársai azonosították a dermális IgA autoantigénjét, a TG3-at **(4. ábra)**. Korábban a bőr ezen részében nem mutatták ki az enzimet, ami DH-ban a TG2-vel **(5. ábra)** és a TG1-gyel sem kolokalizálódik, a TG2 csak az epidermisben, a bazális sejtsorokban expresszálódik **(5. ábra)** az egészséges bőrhöz hasonlóan.¹¹



4. ábra. A TG3 (piros) és az IgA (zöld) festődés DH-s bőrben, TG3-IgA kolokalizáció (sárga) a papilláris dermisben.¹¹



5. ábra. TG3 (piros) és TG2 (zöld) festődés DH-s bőrben.¹¹

A dermális IgA és TG3 nem csak a predilekciós helyeken, hanem a tünetmentes bőrben is jelen van DH-ban¹⁶², ezért a bőrtünetek kialakításában helyi tényezők is szerepet játszhatnak, mint például mechanikai hatás, ami a TG3 aktivációjához, a bőrtünetek kialakításához vezethet. Az IgA GMD alatt, évekkel a tünetmentes állapot elérését követően is kimutatható a bőrben, amikor keringő TG3 ellenanyagok már nincsenek jelen.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Ezt valószínűleg az magyarázza, hogy a TG3 aktív marad a dermisben¹⁶⁶, és az IgA-t szorosan az ECM-hoz köti.

Sárdy és munkatársai azt is igazolták, hogy DH-ban nagy affinitású és aviditású keringő TG3 elleni IgA antitestek mutathatók ki. A TG3 ellenanyagok coeliákiában is jelen vannak, így önmagában a TG3 antitest jelenléte nem magyarázza a DH és a coeliákia közötti különbséget. Amikor a keresztreakgáló antitesteket coeliákiában rekombináns TG2-vel preabszorbeálták, nem csak a TG2, de a TG3 aktivitás is eltűnt, ami arra utal,

hogy az elsődleges autoantigén coeliákiában a TG2, és a TG2 antitestek keresztreakálnak a TG3-mal. A DH savó a preabszorpció után még mindig tartalmazott egy kizárólag TG3 elleni, nagy affinitású és aviditású antitest populációt.¹¹ A TG2 és a TG3 homológiája egyes, enzimatikailag aktív régiókban eléri a 64%-ot⁴¹, filogenetikailag a két TG közeli rokonságban áll⁴⁰, ezért a TG2 és TG3 antitestek közötti keresztreakció nem meglepő.

Az, hogy a nagy affinitású és aviditású TG3 elleni IgA antitestek DH-ban közvetlenül a TG3 ellen termelődnek, vagy epitope spreading (epitóp ugrás) révén alakulnak ki, továbbra is kérdéses, hiszen a dermális TG3 eredete ismeretlen volt.

A TG3 antitestek szenzitivitásával kapcsolatban DH-ban 45-95%, specificitásával kapcsolatban 92-100% közötti eredményeket publikáltak^{11, 165, 167-169}, és olyan esetben is kimutathatóak, amikor a TG2 antitestek nem.^{167, 169}

A TG3 antitest titer DH-ban magasabb és sokkal gyakrabban pozitív, mint coeliákia esetében, ahol a kezeletlen betegek 11-50%-nál lehet kimutatni.^{165, 167, 168, 170-173}

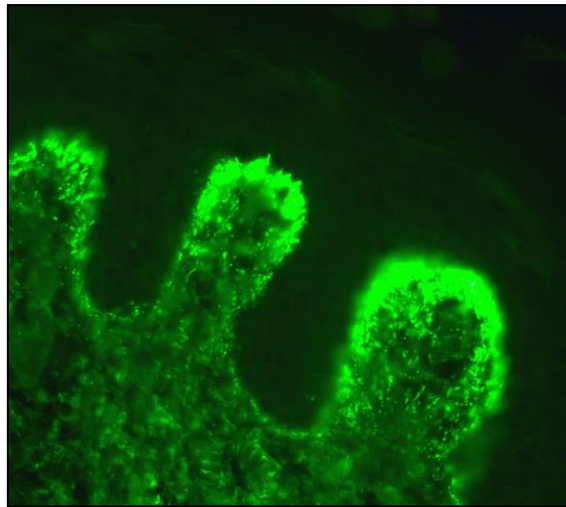
GMD alatt a TG3 antitestek a TG2 antitesttel és az EMA-val párhuzamosan, de lassabban csökkennek DH-ban, teljesen nem tűnnek el a keringésből, ezért a diéta ellenőrzésénél továbbra is az EMA és/vagy a TG2 ellenanyagoknak van létjogosultsága.¹⁶⁵ Coeliákiában az alacsony affinitású és aviditású TG3 antitestek glutén dependenciája nem ennyire egyértelmű, úgy tűnik, hogy GMD mellett nem csökkennek szignifikánsan.¹⁷¹

A TG3 és a TG2 antitest titer korrelációjával kapcsolatban ellentmondó adatok szerepelnek az irodalomban. Borroni és Marietta DH-ban szignifikáns korrelációt írtak le, míg GSE-ben ez nem igazolódott.^{170, 171} Ress és munkatársai GSE-ben is szignifikáns korrelációt igazoltak.¹⁷³ A TG3 ellenanyag titere a TG2 antitesttel ellentétben nem korrelál a villus atrophia súlyosságával.¹⁷¹

TG3 antitestek epitope spreading révén alakulnak ki néma/látens coeliákiában tartós gliadin fogyasztás mellett, amit alátámaszt az is, hogy a TG3 ellenanyag szintje gyermekkori GSE-ben alacsonyabb, mint DH-ban, de az életkor növekedésével a TG3 szintje is megnő.¹⁷² Ezenkívül gyermekkorban a DH előfordulása ritkább, Finnországban az összes esetnek mindössze 4%-a.¹¹⁹

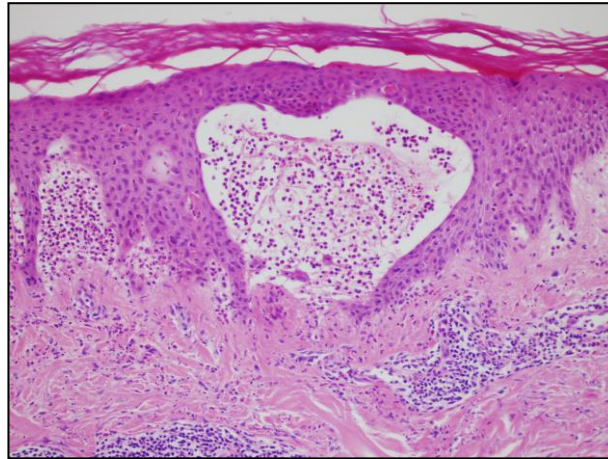
2.2.4. A DH diagnosztikája

A diagnosztika alapja, a „gold standard” a bőr direkt immunfluoreszcens vizsgálata, mely a perilezionális területről vett szövetmintán történik. Granuláris IgA precipitátum látható a dermális papilla csúcsán (**6. ábra**), ami a bazálmembrán mentén is megjelenhet. Az IgA festődésen kívül esetenként C3, IgG, IgM, C1q és fibrinogén festődés is megfigyelhető.¹⁷⁴



6.ábra. A DH-s bőr DIF képe perilesionális területről (FITC-konjugált anti-humán IgA, 40x). Granuláris IgA csapadék a dermális papillák csúcsán (a SE Bőrklinika Immunfluoreszcens Laboratóriumának saját anyagából).

A rutin szövettani vizsgálat önmagában nem diagnosztikus, a hisztológiai kép gyakran aspecifikus. Szubepidermális hólyagképződés, neutrophil és eosinophil granulocytákból álló microabscessus, papilláris fibrin lerakódás, perivascularis lymphohistiocyter beszűrődés, valamint a dermisben oedema látható (**7. ábra**).¹⁷⁵

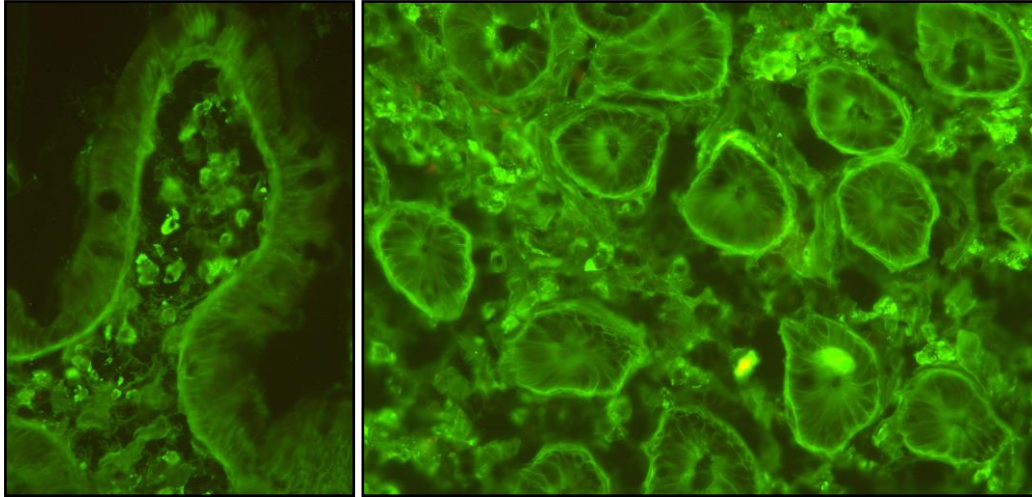


7. ábra. A DH-s bőr szövettani képe (HE, 20x). Szubepidermális hólyagképződés, perivascularis lymphohistiocyter beszűrődés, a dermális papilla területén neutrophil és eosinophil granulocytákból álló microabscessus és fibrin depozitum látható (a SE Bőrklinika Szövettani Laboratóriumának saját anyagából).

GSE irányában szükséges a betegeknél az immunszerológiai vizsgálatok elvégzése (anti-TG2 IgA, IgG ELISA, EMA, IgA deamidált gliadin ellenanyag) az esetleges IgA deficiencia kizárása mellett, mely a coeliákiás páciensek kb. 2-3%-át érinti.¹⁷⁶ A vékonybél rutin szövettani vizsgálata ajánlott a GMD megkezdése előtt, a duodenum/jejunum területéről endoszkópia során vett többszörös biopsziából. Malabszorpciós tünetek, illetve egyéb gastrointesztinalis társbetegségre, malignitásra utaló tünetek esetén mindenképpen elvégzendő a vékonybél biopszia. Napjainkban a patológusok a módosított Marsh-Oberhuber klasszifikációt használják, mely a boholykárosodás mellett a kripták állapotát és az IEL szám emelkedését is figyelembe veszi. GSE esetében villusatrophia, cryptahyperplasia, IEL szám emelkedés látható, valamint a lamina propria gyulladásos infiltrációja.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

A súlyos boholyatrophia előfordulása DH-ban ritkább, illetve mozaikszerűen, foltosan észlelhető, és a betegek 25%-ánál nem igazolható villusatrophia.^{110, 117} Ezekben az esetekben általában a GSE egyéb jelei, a megnövekedett számú intraepitelialis gamma/delta T-limfocita szám¹⁸⁰, valamint a vékonybél direkt immunfluoreszcens vizsgálatával a TG2-specifikus IgA festődés a lamina propriában diszkrét morfológiai eltéréseknél is igazolja a diagnózist (**8. ábra**). DH-ban éppen az enteropathia gyakran

foltos eloszlása, változó súlyossága miatt az ép vékonybélnyálkahártyától a teljes boholyatrophiaig a teljes spektrum megfigyelhető.



8. ábra. Vékonybél festődése DH-ban (FITC-konjugált anti-humán IgA, 40x). Kóros IgA festődés a bazálmembrán alatt és a crypták körül a duodenumban. (SE Bőrklinika Immunfluoreszcens Laboratóriumának saját anyagából).

2.2.5. A DH terápiája

2.2.5.1. Gluténmentes diéta

A DH oki terápiája jelen tudásunk szerint az élethosszig tartó GMD, hatására a bőr tünetmentessé válik, a vékonybél nyálkahártya regenerálódik.^{98, 99, 164} A Codex Alimentarius 18-1981 szabványa szerint akkor minősíthető gluténmentesnek az étel, ha a gluténtartalmú gabona komponensének teljes nitrogén-tartalma nem haladja meg a 0,05 g-ot 100 g szilárd fázisú gabonatermékben.¹⁸¹ Magyarországon a 41/2009/EK rendelet alapján (2009. január 20.), mely előírásait 2012. január 1-től kötelező alkalmazni, a „gluténmentes” kifejezés akkor tüntethető fel, ha a gluténtartalom a végső fogyasztó számára értékesített élelmiszerben nem haladja meg a 20 mg/kg-ot. Korábbi ajánlások a búza, rozs, árpa és a zab teljes kerülését javasolták, ma már a zab több tanulmány szerint is fogyasztható, nem toxikus, amennyiben a gyártó biztosítja a gluténmentességet.^{182, 183} A bőrtünetek a diéta kezdete után csak hetekkel, hónapokkal

javulnak, előfordul azonban, hogy hosszabb idő is eltelik a teljes tünetmentességig. Ismételt glutén fogyasztás mellett a bőrtünetek visszatérnek.¹⁸⁴ Szigorú GMD mellett szignifikánsan csökken az ösztörtalitás és a kardiovasculáris megbetegedések okozta mortalitás DH-ban. A legalább öt évig tartó szigorú GMD hatására a lymphoproliferatív betegségek aránya is csökken.¹⁸⁵

Az irodalomban beszámolnak olyan esetekről, ahol a páciensek a diéta elhagyását követően tartós, évekig tartó remisszióba kerültek.^{107, 186} Előfordulnak refrakter esetek, melyek nem reagálnak a szigorú GMD-ra. Egy finn tanulmány során azt találták, hogy a betegek 1,7%-ánál dapson kezelésre is szükség volt annak ellenére, hogy átlagosan 16 éve szigorú GMD-t folytattak. A bőrtünetekkel ellentétben a vékonybél nyálkahártya GMD mellett regenerálódik refrakter DH-ban¹⁸⁷, ami eltér a refrakter coeliákiától, ahol az enteropathia diéta mellett nem javul és a szövödmények, a vékonybél lymphomák kialakulási esélye jelentősen megnő.¹⁸⁸

2.2.5.2. Dapson terápia

A dapson (4,4'-diaminodiphenyl-sulfon) egy szulfon származék, a DH tüneti terápiaja. DH-ban gyorsan tünetmentesíti a bőrt, a viszketés és a klinikai tünetek néhány nap alatt jelentősen javulnak, de az enteropathiára és a dermális IgA precipitátumra nincs hatással.¹⁷⁴ A vékonybélben szívódik fel és a májban metabolizálódik, majd a vesén keresztül ürül a szervezetből, de az enterohepatikus körforgásban is részt vehet.¹⁸⁹ A teljes tünetmentesség elérése DH-ban GMD mellett akár hónapokig is eltarthat, ezért átmenetileg dapson adása is szükségessé válhat általában napi 25-50 mg kezdő dózisban, ami 100 mg-ig növelhető.¹¹⁵

Hatásmechanizmusa nem teljesen ismert, antimikrobiális és antiinflammatorikus hatása is van. Antimikrobiális hatása miatt közel 70 éve a lepra kezelésére használják.¹⁹⁰ In vitro gátolja a neutrophil granulocyták kemotaxisát, sejtadhézióját, a komplementrendszer aktiválódását, a reaktív oxigén intermediereket, a myeloperoxidázokat, a proinflammatorikus citokineket, valamint a proszttaglandinok és leukotriének termelődését.¹⁹¹

A dapson leggyakoribb dóziszfüggő haematológiai mellékhatásai a methaemoglobinaemia, a hemolízis és az agranulocytosis, melyek 100 mg napi dózis

alatt ritkán fordulnak elő. A mellékhatások általában dózisfüggőek, anaemia, kardiopulmonális betegség, glükóz-6 foszfát-dehidrogenáz hiány, vagy egyéb társbetegség esetén gyakoribbak.¹⁹² A dapson túlérzékenységi reakciót válthat ki, ami lázzal, rossz közérzettel, lymphadenopathiával és exanthemával jár, de akár sokszervi elégtelenséghez is vezethet.¹⁹⁰

A DH szövődményeit és társbetegségeit a dolgozat nem tárgyalja.

2.2.6. Az immunkomplex elmélet háttére dermatitis herpetiformisban

Bár régóta feltételezik és számos adat utal rá, hogy a DH egy immunkomplex betegség¹⁹³⁻¹⁹⁵, keringő TG3-IgA immunkomplexeket eddig nem sikerült azonosítani. A klasszikus autoimmun bullosisokkal ellentétben, ahol a bőrben lerakódó és a keringő antitestek antigénje megegyezik, DH-ban az IgA antitestek nem kötődnek a bőr egyik strukturális eleméhez sem, nem a dermális ECM ellen termelődnek, ami arra utal, hogy a dermisben lévő IgA-TG3 aggregátumok valójában immunkomplexek. Az IgA depozitumok, vagy „DH testek” ultrastrukturális vizsgálattal az ECM mentén szabálytalan elhelyezkedést mutatnak, amorf csomókként ábrázolódnak.¹³² Kettős immunfluoreszcenciával az IgA a papilláris dermis csúcsán^{11, 162, 166} és a dermális érfalakban is kolokalizálódik a TG3-mal. Preisz és munkatársai szignifikáns IgA és C3 pozitív érfestődést írtak le.¹⁹⁶

Néhány DH-s betegben vesebiopsziával IgA immunkomplexeket mutattak ki, melyek nephropathiát nem okoztak.¹⁹⁷ Igen ritkán beszámoltak DH-hoz társuló IgA nephropathiáról.¹⁹⁸ DH-s betegekben mindez alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint az immunkomplexek DH-ban jelen vannak a keringésben, és fennakadhatnak különböző szervek mikrocirkulációs rendszereiben. DH-ban HLA-B8 pozitivitással összefüggő gyenge RES funkciót mutattak ki, ami elégtelen immunkomplex eliminációt eredményezhet.¹⁹⁹

A TG3 egészséges bőrben az epidermis felső rétegiben, a stratum granulosum és a stratum corneum területén expresszálódik, a papilláris dermisben sem a TG3, sem a TG2 nem fejeződik ki, a TG3-IgA depozitum epidermális eredete kérdéses. A vékonybélben eddig nem sikerült kimutatni, de több szövetben expresszálódik, így

egyéb extracutan eredet is elképzelhető.^{11, 16, 51}

Egyes szerzők szerint a papilláris TG3 precipitátum az epidermisből származik, mely a bazálmembránon átdiffundálva komplexet alkot a keringésből kilépő IgA típusú TG3 antitestekkel.^{162, 200}

2.2.7. Fibrinogén-fibrin-fibrinolízis patológia DH-ban

Évtizedekkel ezelőtt leírták, hogy DH-ban már az IgA megjelenése előtt extravascularis fibrinogén, fibrin és fibronectin jelenik meg a papilláris dermisben.²⁰¹⁻²⁰⁴ A közelmúltban igazolták, hogy a dermális IgA-TG3 csapadékban a TG3 megőrzi enzimatisz aktivitását és fibrinogént köt, mely az IgA-TG3 lokalizációjával megegyezik és hasonló intenzitású festődést mutat.¹⁶⁶ A betegek egy részénél akrálisan a kézujjakon, esetenként a lábujjakon petechiák, purpurák jelennek meg.^{104, 205} Kutatócsoportunk a közelmúltban publikálta, hogy kezeletlen betegeknél váratlanul magas a cryofibrinogénémia előfordulása, míg GMD és/vagy dapson terápia mellett ez jelentősen csökken, vagy megszűnik.²⁰⁶ Előzetes adataink azt is jelezték, hogy a dapson in vitro csökkentheti a cryofibrinogén mennyiségét²⁰⁷, de a hatás mechanizmusa ismeretlen maradt.

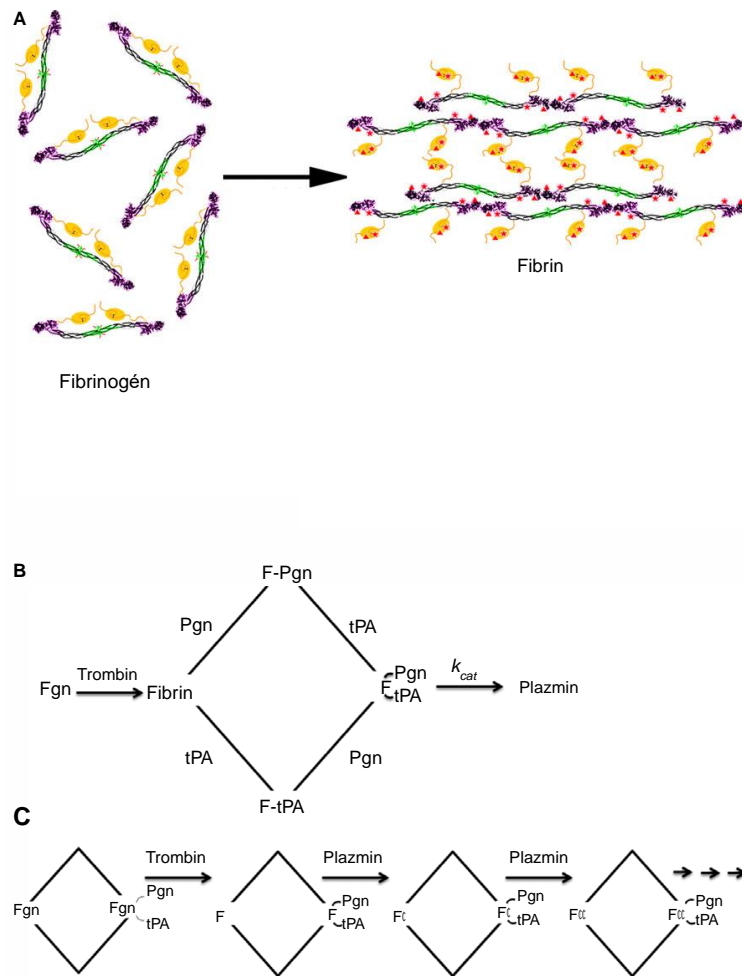
In vivo tünetes DH-s beteg autológ szérumának subcután bevitele a bőrön az injekció helyén a DH-ra jellemző tüneteket provokált, ugyanez heparinnal, vagy az antifibrinolitikus hatású ϵ -aminokapronsavval előkezelt plazmával már nem provokálható.²⁰⁸ Néhány korábbi tanulmányban beszámolnak a heparin kezelés hatásosságáról súlyos, disszeminált DH-ban szenvedő pácienseknél, akik a szulfonszármazékokat valamilyen ok miatt nem tolerálták.²⁰⁹⁻²¹¹ A terápiás hatás mögötti mechanizmus ismeretlen. A cryofibrinogénémia DH-ban egy hőmérsékletfüggő, keringő fibrinogénhez kapcsolható patológiára utal.

Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy a fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszer is szerepet játszik a DH patomechanizmusában. Célul tűztük ki a betegek plazma mintájában a fibrinogén funkcionális vizsgálatát, azért is, mert elsősorban a plazma a dermális IgA-TG3 csapadék mellett lerakódó fibrinogén forrása DH-ban.

A fibrinogén 3 pár polipeptid láncból áll ($A\alpha$, $B\beta$, γ). A fibrin fibrinogénből jön létre trombin hatására, fibrin monomerek nem kovalens polimerizációjával és izopeptid kötések kialakulásával. A fibrinhálót a FXIII-A stabilizálja kovalens kötésekkel **(9. ábra)**.²¹² Ez a folyamat a gyulladásos folyamatok esetében is jelen van.^{85, 86} A fibrin oldását a plazmin katalizálja, ami plazminogénből keletkezik tPA hatására **(9. ábra)**, rendkívül érzékeny különböző biomechanikai, kémiai és celluláris faktorokra.^{212, 213}

A fibrinszálak átmérője, az alvadék szerkezete és a fibrinolízis folyamata között szoros összefüggés van. Egyfelől a vékony fibrinszálú alvadék (pl. magas trombin koncentráció esetén) lassabban oldódik a lízis során, ellentétben a vastag fibrinszálakból álló alvadékkal, annak ellenére, hogy a vékony fibrinszál önmagában gyorsabban oldódik. Ez a látszólagos ellentmondás azzal magyarázható, hogy a plazmin egy fibrinszálon belül a protofibrilek között gyorsabban diffundál, mint az alvadékban a fibrinszálak pórusain keresztül.²¹² Másfelől a plazmin egy optimális távolságot igényel a fibrin protofibrilek között a hatékony lízishez, ami megfelel a plazmin molekula méretének. Ha a fibrinszál azért vastagabb, mert több protofibrilt tartalmaz, de azok távolsága optimális, a lízis gyorsabb, mert egy keresztmetszetben egy plazmin több protofibrilt képes átvágni anélkül, hogy diffundálnia kell.²¹⁴ Ha viszont a fibrinszál azért vastagabb, mert a protofibrilek nagyobb távolságon vannak egymástól, akkor a plazmin molekula mozgása egy keresztmetszetben sem optimális, ezért lassabb a lízis.²¹⁵

A fibrin alvadék szerkezetét számos celluláris és humorális tényező szabályozza. A vörösvérsejtek beépülése az alvadékba, a neutrophil granulocytaból felszabaduló hiszton és DNS molekulák, az alvadékra gyakorolt mechanikai hatás a fibrinszálak megnyúlása révén növelik a fibrinolitikus rezisztenciát, míg például a tPA koncentráció emelkedése fokozza a lízist.²¹²



9. ábra. A fibrinogén-fibrin átalakulás és a fibrinolízis folyamata.²¹² **(A)** A fibrinogén központi doménje (zöld) az N-terminális fibrinopeptid A és B-vel (piros), amit a trombin az A α láncok és a B β láncok N-terminális végéről hasít, valamint a fibrinogén distális doménje (lila), ami az A α láncok és a B β láncok C-terminális részeit tartalmazza. A trombin hatására a fibrinopeptid A lehasad, így két másik fibrin molekula γ láncához (sárga) nem-kovalens kötéssel tud kapcsolódni. A protofibril kétszálú, egymást félig átfedő fibrin monomerekből áll, a fibrinopeptid B hasításával kapcsolódhatnak vastagabb rostokká. Plazminogén (csillag) és tPA (háromszög) kötőhelyek. A FXIIIa kovalens keresztkötéseket alakít ki a szomszédos fibrin monomerek γ és α láncai között. **(B)** Plazmin aktiváció a fibrin-tPA-plazminogén komplex (F-tPA-Pgn) hatására. **(C)** A fibrinogén-fibrin-fibrin degradációs termékek (F', F'') átalakulása plazmin hatására. A fibrin degradációs termékek tPA-t és plazminogént kötnek a lízis fenntartásához.

3. Célkitűzések

1. A bevezetésben részletezett klinikai és immunológiai jellemzők miatt azt feltételezzük, hogy a DH egy immunkomplex betegség. Célul tűztük ki keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatását egy erre a célra általunk kifejlesztett szendvics ELISA technika segítségével.
2. Vizsgáltuk, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplex és az anti-TG3 IgA ellenanyag szintek között van-e kapcsolat. Célunk volt, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplexek glutén dependenciáját vizsgáljuk. Retrospektív vizsgálat során kezeletlen, majd szigorú GMD alatt tünetmentes DH páciensek keringő TG3-IgA immunkomplex szintjét vizsgáltuk.
3. A bevezetésben ismertetett adatok alapján feltételezhető a fibrinogén-fibrin-fibrinolízis rendszer patológiája DH esetében. Célul tűztük ki DH-s páciensek fibrin képző és fibrinolitikus kapacitásának elemzését.
4. Célul tűztük ki a fibrinháló szerkezeti vizsgálatát. Arra kerestük a választ, hogy az esetleges fibrinolitikus eltérések kapcsolatban állnak-e a fibrinháló szerkezeti változásaival.
5. Kíváncsiak voltunk, hogy a DH tüneti kezeléseként alkalmazott dapson in vitro hatással van-e a fibrinolitikus paraméterekre, valamint a fibrin szerkezetére.

4. Módszerek

4.1. A DH diagnosztikája

A DH diagnózisa a klinikai tüneteken, a bőr szövettani és DIF vizsgálatán, valamint a szérumban anti-TG2 IgA, IgG ELISA és/vagy EMA teszteken alapult. Minden páciens esetében elvégeztük az anti-TG3 IgA ELISA vizsgálatot is.

4.1.1. Szövettani vizsgálat

A rutin hisztológiai vizsgálat 10 µm-es paraffinba ágyazott, hematoxin-eozinnal (HE) festett metszeteken történt a SE Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika Szövettani Laboratóriumában.

4.1.2. Direkt immunfluoreszcens vizsgálat

Az immunfluoreszcens vizsgálatokat 5-10 µm-es fagyasztott bőr metszeteken végeztük. A festéshez a fluoreszcein-isotiocianáttal (FITC) konjugált anti-humán C3 és IgA ellenanyagokat 1:40-es, az IgG és IgM ellenanyagokat (Dako, Glostrup, Denmark) 1:100-as hígításban használtuk.

4.1.3. EMA, anti-TG2 IgA ELISA

Az EMA vizsgálata indirekt immunfluoreszcenciával történt (ImmuGlo IMMCO Diagnostics, Buffalo, NY).

Az anti-TG2 IgA antitestek kimutatását ELISA módszerrel végeztük (Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany). A gyártó által megadott cut off érték 10 AU/ml volt.

4.1.4. Anti-TG3 IgA ELISA

Az anti-TG3 IgA antitestek kimutatása ELISA módszerrel történt (Immundiagnostik, Bensheim, Germany). A gyártó által megadott cut off érték 22 AU/ml volt.

4.2. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat

4.2.1. Betegek és módszer

35 kezeletlen DH-s beteget (ffi:nő=20:15, átlag életkor 44 ± 18 , 10-78 év) (**3. táblázat**) és 40 kontroll személyt vontunk be a vizsgálatba; 16 egészséges felnőttet (ffi:nő=8:8, átlag életkor 41 ± 15 , 26-73 év, 12 pemphigus vulgarisban (PV) szenvedő páciens (ffi:nő=5:7, 54 ± 12 év, 36-71 év), és 12 szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő páciens (ffi:nő=1:11, átlag életkor 42 ± 12 , 27-74 év).

10 kezeletlen DH-s beteget (ffi:nő=4:6) vizsgáltunk kezeletlen állapotban, és GMD után (GMD átlagos időtartama 5,8 év), tünetmentes állapotban (**4. táblázat**).

8 kezeletlen DH-s beteg (ffi:nő=5:3, átlag életkor 49 ± 12 év, 16-74 év) és 7 egészséges kontroll személy (ffi:nő=3:4, átlag életkor 49 ± 16 év, 28-75 év) egyazon időpontban levett plazma és szérum mintáját hasonlítottuk össze.

6 kezeletlen DH-s páciens (ffi:nő=4:2, átlag életkor 47 ± 12 év, 16-78 év) és 6 egészséges kontroll személy (ffi:nő=2:4, átlag életkor 51 ± 14 , 30-73 év) savóit vizsgáltuk párhuzamosan BSA blokkolással, és BSA blokkolás nélkül.

3. táblázat. Kezeletlen DH-s páciensek klinikai és immunszerológiai adatai (n=35) az anti-TG3 IgA pozitív (1-22. beteg), az anti-TG3 IgA negatív (28-35. beteg) betegeknél, és a szürke zónába eső anti-TG3 IgA értékek (23-27. beteg) esetén. Az abszorbancia értékek (A_{450}) a keringő TG3-IgA immunkomplex szinteket jelölik.

Betegek	Életkor/Nem	Bőrtünetek kezdete	EMA	Anti-TG2 IgA ELISA (AU/ml) ¹	Anti-TG3 IgA ELISA (AU/ml) ²	A_{450} ³
1	53/ffi	6 hó	Poz.	99	31	0,43
2	31/ffi	20 év	Poz.	>100	69	0,55
3	53/ffi	6 hó	Poz.	88	104	1,64
4	44/ffi	5 év	Poz.	>100	103	0,80
5	39/ffi	10 hó	Poz.	>100	81	0,56
6	29/nő	2 év	Poz.	>100	>200	0,48
7	78/ffi	7 hó	Neg.	33	74	0,45
8	75/nő	3év	Neg.	65	125	0,6
9	49/nő	8 év	Poz.	37	39	0,45
10	23/ffi	2 év	Poz.	>100	118	0,63
11	46/nő	1 év	Poz.	>100	85	1,68
12	16/nő	1.5 év	Poz.	>100	148	0,83
13	78/ffi	10 év	Poz.	>100	24	1,21
14	19/nő	4 hó	Poz.	>100	112	0,5
15	45/ffi	37 év	Poz.	>100	80	0,44
16	28/nő	1.5 év	Poz.	40	168	0,42
17	32/nő	10 év	Neg.	<10	24	0,68
18	68/ffi	1 év	Neg.	22	77	0,71
19	74/ffi	6 hó	Poz.	>100	>200	0,58
20	31/nő	6 év	Poz.	>100	>200	1,75
21	54/nő	6 hó	Neg.	>100	>200	0,97
22	59/ffi	7 hó	Neg.	<10	>200	0,29
23	44/ffi	1 év	Neg.	<10	20	0,67
24	36/ffi	1 év	Neg.	<10	21	0,52
25	59/ffi	3 hó	Neg.	<10	17	1,97
26	49/ffi	1 év	Neg.	<10	16	1,00
27	73/nő	8 hó	Neg.	<10	16	0,29
28	45/ffi	10 év	Poz.	44	6	1,04
29	25/nő	8 hó	Neg.	<10	6	1,86
30	26/nő	10 év	Poz.	20	11	0,32
31	34/ffi	1 év	Poz.	<10	4	0,79
32	38/ffi	1,5 év	Poz.	42	14	1,68
33	65/ffi	6 hó	Neg.	<10	2	0,54
34	10/nő	6 hó	Neg.	<10	13	1,81
35	37/ffi	5 hó	Neg.	<10	14	0,33

¹ Pozitív: >10 AU/ml, negatív: ≤10 AU/ml.

² Pozitív: >22 AU/ml, negatív: <16 AU/ml, 16-22 AU/ml: szürke zóna a gyártó ajánlása szerint.

³ Az egészséges kontroll csoportnál mért abszorbancia érték: 0,3025, [0,2588-0,4981] (medián, [IQR]).

4. táblázat. DH-s betegek (n=10) klinikai és laboratóriumi jellemzői kezeletlen állapotban, valamint tünetmentes állapotban, GMD alatt. Az abszorbancia értékek (A_{450}) a keringő TG3-IgA immunkomplex szinteket jelölik.

Betegek Sorszám/Nem	Életkor a GMD előtt és után	Bőrtünetek	GMD (időtartama években)	Anti- TG2 IgA ELISA (AU/ml) ¹	Anti- TG3 IgA ELISA (AU/ml) ²	A_{450} ³
1/ffi	35	Igen	Nincs	>100	38	0,76
	45	Nem	10	<10	3	0,68
2/nő	49	Igen	Nincs	>100	72	0,91
	58	Nem	9,5	<10	9	0,59
3/ffi	24	Igen	Nincs	81	37	1,19
	29	Nem	4,5	<10	1	1,01
4/nő	32	Igen	Nincs	89	>200	0,75
	35	Nem	3	<10	6	0,59
5/nő	34	Igen	Nincs	>100	78	3,90
	38	Nem	3,5	<10	2	0,44
6/ffi	22	Igen	Nincs	44	34	1,32
	29	Nem	7	<10	4	1,27
7/ffi	39	Igen	Nincs	>300	81	0,52
	40	Nem	1	<10	6	0,28
8/ffi	10	Igen	Nincs	6	13	0,41
	18	Nem	7,5	<10	3	0,39
9/nő	10	Igen	Nincs	6	5	2,10
	22	Nem	12	<10	3	1,71
10/nő	24	Igen	Nincs	2	73	0,91
	26	Nem	1,5	<10	6	0,52

¹ Pozitív: >10 AU/ml, negatív: ≤10 AU/ml.

² Pozitív: >22 AU/ml, negatív: <16 AU/ml, 16-22 AU/ml: szürke zóna a gyártó ajánlása szerint.

4.2.2. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA

A keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatásához saját fejlesztésű szemikvantitatív szendvics ELISA technikát alkalmaztunk.

A 96 lyukú mikrotiter lemezeket (Nunc Maxisorp, Apogent, Roskilde, Denmark) 100 µl poliklonális kecske anti-humán TG3 antitesttel²⁰⁰ inkubáltuk overnight szobahőmérsékleten (1x-es PBS-ben hígítva, pH 7.4). A korábban részletesen vizsgált poliklonális anti-humán TG3 antitest DIF technikával nem reagált humán duodenummal, így a TG2-vel való szignifikáns keresztreakció kizárható volt (az adatok nem szerepelnek a vizsgálatban).

A lemezeket 100 µl 1%-os BSA-val (BSA, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, 1x-es PBS-ben hígítva) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőn, majd a mikrotiter lemezekre helyeztük a 100 µl-es plazma/szérum mintákat, és 1 órán keresztül inkubáltuk. A közforgalomban elérhető anti-humán TG3 IgA ELISA kit (Immundiagnostik, Bensheim, Germany) reagenseivel folytattuk a lépéseket. A következő inkubációs lépés során a mintákhoz 100 µl peroxidázzal konjugált rabbit anti-humán IgA antitestet, majd egy újabb mosást követően 100 µl tetrametilbenzidin szubsztátot adtunk, amivel tovább inkubáltuk a lemezen lévő mintákat 15 percig. Végül egy savas STOP oldat hozzáadásával leállítottuk az enzimátikus folyamatot. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük (A_{450}) mikroplate olvasó segítségével (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). A plazma/szérum mintákat 1:10-hez hígítottuk (1x-es PBS-ben), triplikátumokat mértünk. A mosási lépések 5x250 ml mosó pufferrel történtek (Immundiagnostik, Bensheim, Germany). Az ELISA lépéseit szobahőn végeztünk.

4.2.3. Statisztikai elemzés

A statisztikai számításokat Statistica 8.0 szoftverrel (Statsoft Inc, Tulsa, OK) végeztük. Az adatok eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk teszttel történt. Az adatokat medián értékekkel és a hozzá tartozó interkvartilis tartománnyal [IQR] jelöltük. A csoportok közötti különbségeket Mann–Whitney U teszt, Wilcoxon teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével elemeztük. A post-hoc elemzéseket multiple comparisons of mean ranks

for all groups és Tukey tesztekkel végeztük. A $p \leq 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4.3. A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata

4.3.1. Betegek és módszer

23 DH-s beteg (ffi:nő=17:6, átlag életkor 41 ± 13 , 21-74 év) (**5. táblázat**) és 12 egészséges kontroll személy (ffi:nő=6:6, átlag életkor 33 ± 10 , 23-55 év) friss plazmájában és szérumában a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) indukálta fibrinolízis-időt (globális fibrinolitikus potenciál indikátora) és az alvadék maximális turbiditását (a fibrin szerkezet indikátora) mértük spektrofotométer segítségével 340 nm-en 37 °C-on. A kontroll személyek egészséges felnőttek, akik véralvadást befolyásoló gyógyszerkészítményt nem szedtek. A DH-s betegeket a következő csoportokba soroltuk: 7/23 kezeletlen, tünetes páciens, 5/23 dapsonnal kezelt (3/5 intermittáló GMD-t is folytatott), 11/23 szigorú GMD mellett (**5. táblázat**). A dapson kezelést azoknál a pácienseknél kezdtük el, akik gyors javulást szerettek volna, vagy más intézményekben kezdték el náluk a terápiát.

A dapson hatásának in vitro vizsgálatához 2 kezeletlen DH-s páciens (2 ffi, P22, P23) (**5. táblázat**) és két egészséges kontroll személyt (2 ffi, 29 és 39 évesek) vontunk be.

Külön vizsgálatként 5 pemphigus vulgarisban szenvedő páciens (**5. táblázat**) és 7 egészséges kontroll személy (ffi:nő=2:5, átlag életkor 44 ± 18 év, 25-72 év) adatait hasonlítottuk össze.

A beteg csoport és a kontroll csoport fibrinogén szintje a normál tartományba esett (1.5-4 g/dl).

5. táblázat. A turbidimetriás lízis vizsgálatba bevont DH-s betegek (n=23) klinikai és laboratóriumi adatai, és a külön vizsgált PV-os betegek jellemzői (n=5).

Betegek	Életkor /Nem	DH/ PV kezdet	Bőr- tünet	GMD	Dap- son	EMA	anti- TG2 IgA ELISA (AU/ ml) ¹	anti- TG3 IgA ELISA A (AU/ ml) ²	Cryo- protein	Lízis idő (min) ⁴ plazma/ szérum	A ₃₄₀ ³ plazma/ szérum
1 = P1	31/nő	6 év	Igen	Nem	Nem	Poz	>100	235	Neg	39,5/ 58,6	0,634/ 0,191
2 = P2	26/nő	8 év	Igen	Igen	Igen	Neg	<10	20	Neg	20,6/ 73,7	0,202/ 0,316
3 = P3	44/ffi	33 év	Nem	Nem	Igen	Poz	<10	33	CF ++	35,2/ 100,5	0,314/ 0,262
4	36/ffi	1 év	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	20	Neg	121,1/ 88,2	0,345/ 0,239
5	30/nő	25 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	15	Neg	93,3/ 69,5	0,409/ 0,268
6	29/ffi	23 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	10	CF +	31,0/ 82,7	0,495/ 0,251
7	27/nő	23 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	5	CF +	35,2/ 41,4	0,561/ 0,261
8	21/ffi	15 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	9	Neg	31,0/ 45,4	0,387/ 0,251
9	60/ffi	10 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	20	CF +	38,6/ 92,1	0,318/ 0,265
10	29/ffi	6 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	2	Neg	50,1/ 64,3	0,361/ 0,273
11	27/ffi	24 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	8	Neg	56,6/ 82,2	0,387/ 0,241
12	26/ffi	5 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	1	Neg	46,0/ 66,3	0,350/ 0,172
13	61/ffi	1 év	Nem	Igen	Igen	Neg	<10	35	Neg	29,5/ 78,7	0,301/ 0,247
14	64/nő	8 év	Igen	Nem	Igen	Neg	<10	15	Neg	30,8/ 53,4	0,452/ 0,272
15	23/ffi	17 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	8	Neg	31,4/ 152,9	0,312/ 0,224
16	43/ffi	23 év	Igen	Igen	Igen	Neg	<10	15	Neg	38,4/ 97,1	0,352/ 0,282
17	45/ffi	1 év	Igen	Igen	Nem	Neg	<10	20	CF +	31,8/ 76,5	0,302/ 0,241
18	44/ffi	37 év	Igen	Nem	Nem	Poz	>100	80	CF ++, CG +	55,8/ 51,3	0,437/ 0,220
19	49/ffi	1 év	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	16	Neg	103,5/ 69,6	0,418/ 0,219
20	40/nő	31 év	Nem	Igen	Nem	Neg	<10	5	Neg	42,4/ 65,5	0,382/ 0,278
21	44/ffi	5 év	Igen	Nem	Nem	Poz	>100	103	CF +	25,4/ 66,8	0,275/ 0,208
22	74/ffi	1 év	Igen	Nem	Nem	Poz	>100	>200	Neg	98,8/ 33,4	0,542/ 0,272
23	68/ffi	6 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	22	77	Neg	79,3/ 31,6	0,424/ 0,256
PV1	66/nő	4 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	2	Nincs adat	111,3/ 52,8	0,455/ 0,297
PV2	74/nő	1 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	5	Nincs adat	116,2/ 56,2	0,537/ 0,240
PV3	41/nő	2 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	1	Nincs adat	78,3/ 32,6	0,343/ 0,249
PV4	49/nő	2 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	4	Nincs adat	112,5/ 63,9	0,319/ 0,251
PV5	60/nő	2 hó	Igen	Nem	Nem	Neg	<10	1	Nincs adat	97,3/ 75,2	0,460/ 0,236

1 Pozitív: >10 AU/ml, negatív: ≤ 10 AU/ml

2 Pozitív: >22 AU/ml, negatív: ≤ 22 AU/ml

3 Plazma / szérum mintákat turbidimetriás lízis vizsgálattal elemeztük. A szérum mintákhoz tisztított humán fibrinogént adtunk.

4.3.2. A t-PA-katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása

Kolev és munkatársai által leírt módszert használtuk.²¹⁶ Mivel a fibrinogén–fibrin átalakulás során keletkező fibrinrostok átmérője összevethető a fény hullámhosszával, a fibrinhálón áthaladó fény szóródása során kialakuló turbiditás (opálosság) jelzi a fibrin keletkezését. A turbiditás arányos a fibrinrostok tömeg/hossz arányával²¹⁷, változása a fibrin szerkezetéről is információt hordoz (vastagabb fibrinrostok nagyobb turbiditást eredményeznek). A kialakult fibrin turbiditásának követésével lehet a fibrinolízist monitorozni.²¹⁸⁻²²¹

A plazma rögek kialakításához trombint adtunk (30 U/ml 5 μ l-ben) az 50 μ l citrátos plazma (3,8% citrátos csőben gyűjtve) és az 50 μ l 0,1 μ g/ml szöveti plazminogén aktivátor (tPA) keverékéhez (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany), 150 mM NaCl és 25 mM CaCl_2 tartalmú 10 mM HEPES-NaOH pH 7.4 pufferben.

A szérum lízis vizsgálatánál a HEPES pufferhez az említetteken kívül 2 mg/ml fibrinogént adtunk (humán, plazminogén mentes, Calbiochem, LaJolla, CA). A plazma és szérum mintákat párhuzamosan vettük le, és fagyasztás nélkül, egy órán belül felhasználtuk a cryoprecipitáció elkerülése miatt. A rögeképződés és oldódás folyamatát 340 nm-en (A_{340}) 37 °C-on Zenyth 200 spektrofotométer segítségével elemeztük (Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria). A lízis-idő, amit a maximális turbiditás felével definiáltunk, a fibrinolitikus aktivitást jellemző kvantitatív paraméter. A maximális turbiditás ($A_{340\text{max}}$) a fibrin szerkezetének indikátora.²¹⁴ A nagyobb turbiditás vastagabb fibrin átmérőt és nagyobb pórusú fibrinhálót jelent.^{222, 223} Összehasonlítottuk a beteg és az egészséges csoport lízis-idejét és maximális turbiditását plazmában (fibrinogén dús minták) és szérumban (a beteg fibrinogénjétől mentes, de normál humán fibrinogénnel kiegészített minták) egyaránt.

A dapson hatásának in vitro vizsgálatakor a dapsont terápiás koncentrációban (5 µg/ml) 30 perccel a turbidimetriás lízis vizsgálat előtt közvetlenül a frissen levett plazma mintákhoz adtuk.²²⁴

4.3.3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A lízis görbék alapján ($A_{340\max}$ értékek) **(13. ábra)** a fibrin szerkezeti vizsgálatához 3 DH-s plazma mintát (P1, P2, P3) **(5. táblázat)** és egy egészséges kontroll mintát (átlagos kontroll turbiditás értékkel) választottunk ki.

P1: legmagasabb $A_{340\max}$ érték, anti-TG2 és anti-TG3 IgA ELISA pozitív, kezeletlen DH-s beteg.

P2: legalacsonyabb $A_{340\max}$ érték, anti-TG2 és anti-TG3 IgA ELISA negatív, dapson kezelés és GMD alatt.

P3: átlagos $A_{340\max}$ érték, anti-TG2 IgA ELISA negatív, anti-TG3 IgA ELISA pozitív, dapsonnal kezelt DH-s beteg.

További két kezeletlen, anti-TG2 és TG3 IgA ELISA pozitív DH páciens (P22, P23) **(5. táblázat)** és két egészséges személy fibrin szerkezetét vizsgáltuk plazmában in vitro dapson hozzáadása előtt és után.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Kutatóközpontjának Nanokémiai és Katalízis Intézetében végeztük. A plazma alvadékok a fent leírt módszer alapján készültek (tPA hozzáadása nélkül). 30 perc után 37 °C-on az alvadékokat 1%(v/v)-os kakodilát glutáraldehid pH 7,2 pufferben fixáltuk 16 órán keresztül. A fixált mintákat felszálló alkoholsorral dehidráltuk (20%-96% vol/vol), 1:1 96% (vol/vol) etanol/aceton keverékével, majd tiszta aceton után CO₂-vel való kritikus pont szárítás történt (E3000 Quorum Technologies, Newhaven, UK). A minták ezután adhezív szénlemezre kerültek, melyet aranyozás követett (SC7620 Sputter Coater, Quorum Technologies). Ezt követően a gyártó szoftverével pásztázó elektronmikroszkópos (EVO40 Carl Zeiss) vizsgálatot végeztünk. Különböző nagyításokban digitális fotókat készítettünk, így vizsgálhatóvá vált a fibrinháló szerkezete.

4.3.3.1. A fibrinháló szerkezeti vizsgálata

A kiválasztott minták esetében a SEM felvételek segítségével meghatároztuk a válogatott fibrinszálak átmérőjét egy, a Semmelweis Egyetem Biokémiai Intézetben kidolgozott algoritmus alapján Statistical Toolbox v.7.0 of Matlab 7.10.0.499 (R2010a) szoftver segítségével (The Mathworks, Natick, MA). Az átmérők meghatározásához egy 10-15 egyenlően felosztott horizontális vonalból álló hálót rajzoltunk a kép fölé, és minden fibrinszálat bevontunk a vizsgálatba, amiket kereszteztek. Az átmérőket manuálisan mértük mindegyik SEM felvételen 300 fibrinszálon (mindig a fibrinszál longitudinális tengelyére merőlegesen), mintánként három SEM felvételen.

4.3.3.2. Statisztikai elemzés

A lízis vizsgálat paramétereinek (lízis-idő, $A_{340\max}$) statisztikai elemzését Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük (Statistical Toolbox 7.3 Matlab). A fibrinszálak átmérőjének eloszlását egy, már korábban leírt algoritmus segítségével elemeztük.²²⁵ A különböző mintákra legjobban illeszkedő eloszlásokat Kuiper-teszt segítségével hasonlítottuk össze, és a p -értékeket Monte Carlo eljárással számoltuk. Amikor két eloszlás között statisztikailag szignifikáns különbséget állapítottunk meg, akkor a kvantilis és a variancia számszerű értékeit is statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél definiáltuk.

4.4. Etikai vonatkozások

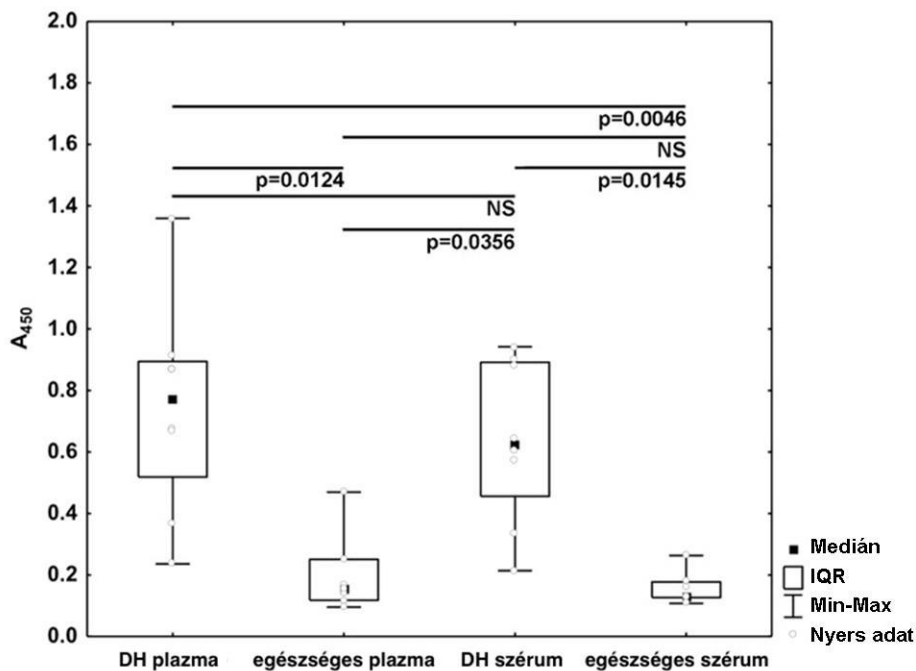
A kutatást a Helsinki Deklarációban foglaltaknak megfelelően, a tájékozott beleegyezés elvét figyelembe véve, a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével végeztük (143/2010., 88/2013.).

5. Eredmények

5.1. Keringő TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat

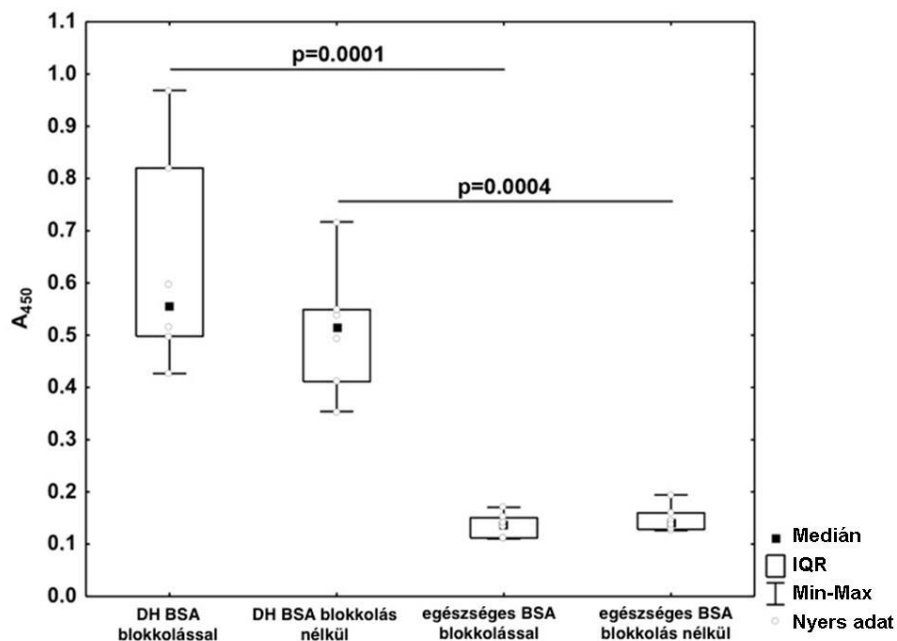
A DH klinikai és immunológiai jellemzői miatt keringő TG3-IgA immunkomplexeket vizsgáltunk egy erre a célra általunk kifejlesztett szendvics ELISA technika segítségével. Az ELISA vizsgálatok eredményeit a triplikátumok átlagából kaptuk. Az ELISA abszorbancia értékek az immunkomplex szinteket jelölik.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a DH csoport és az egészséges kontroll csoport plazmában és szérumban mért immunkomplex szintjei között. A DH csoport immunkomplex szintje plazmában és szérumban is szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges kontroll csoporté (**10. ábra**).



10. ábra. Kezeletlen DH-s betegek és egészséges kontroll személyek plazmában és szérumban mért keringő TG3-IgA ELISA abszorbancia értékei (multiple comparisons of mean ranks for all groups). Az értékeket személyenként 3 paralell vizsgálat adatainak átlagából számítottuk. NS: nem szignifikáns.

A párhuzamosan vizsgált BSA-val blokkolt ($0,6375 \pm 0,2113$) és BSA-val nem blokkolt ($0,5101 \pm 0,1261$) kezeltlen DH-s betegek között, és az egészséges kontroll csoportok között (BSA $0,1366 \pm 0,0232$, BSA nélkül $0,1482 \pm 0,0256$) sem találtunk szignifikáns különbséget ($p=0,3137$ és $p=0,9984$) (Tukey teszt). A DH csoport immunkomplex értékei BSA blokkolással ($p=0,0001$) és BSA blokkolás nélkül is ($p=0,0004$) szignifikánsan magasabbak voltak, mint az egészséges kontroll csoporté (**11. ábra**).



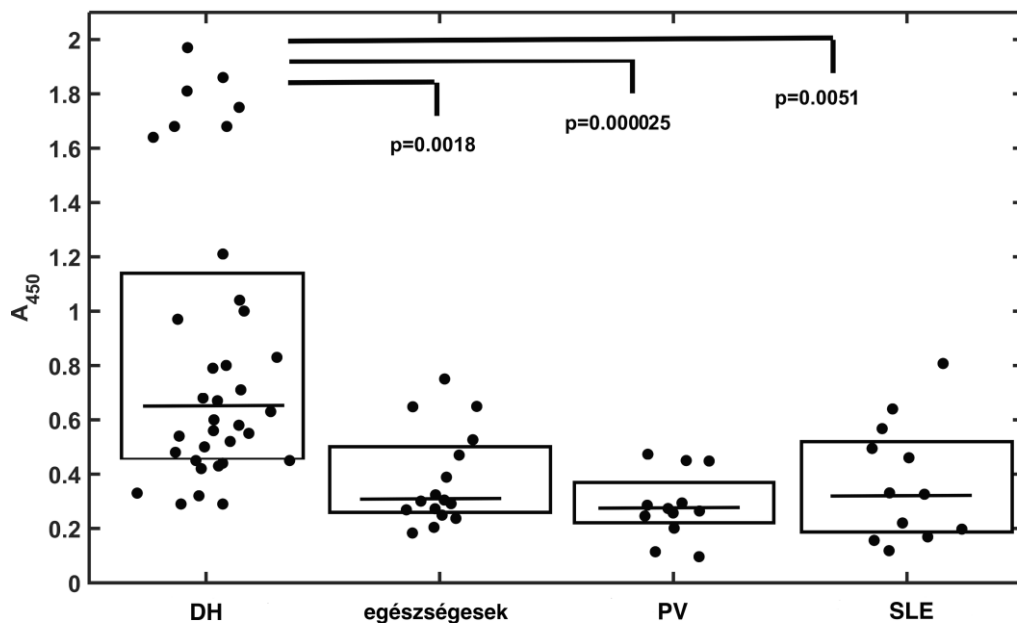
11. ábra. Keringő TG3-IgA ELISA abszorbancia értékek BSA blokkolással és BSA blokkolás nélkül kezeltlen DH-s betegeknél és egészséges kontroll személyeknél (Tukey teszt). Az értékeket személyenként 3 paralell vizsgálat adatainak átlagából számítottuk.

A TG3-IgA immunkomplex ELISA vizsgálat során kapott eredményeket a DH csoport esetében ($n=35$) a **3. táblázat** tartalmazza. A négy vizsgálati csoport TG3-IgA immunkomplex értékei szignifikáns különbséget mutattak ($p<0,01$, Kruskal-Wallis teszt).

Post hoc tesztrel a kezeltlen DH csoport szignifikánsan nagyobb keringő TG3-IgA immunkomplex szintet mutatott (medián A_{450} : 0,6300, IQR [0,4500-1,0400]), mint az egészséges kontroll csoport (0,3025, IQR [0,2588-0,4981], $p<0,01$), a PV csoport

(0,2685, [0,2234-0,3710]) és az SLE csoport (0,3283, [0,1831-0,5308]) ($p < 0,01$) (**12. ábra**). Az egészséges kontroll, a PV és az SLE csoportok immunkomplex értékei között (A_{450}) nem találtunk szignifikáns különbséget ($p > 0,5$) (multiple comparisons of mean ranks for all groups).

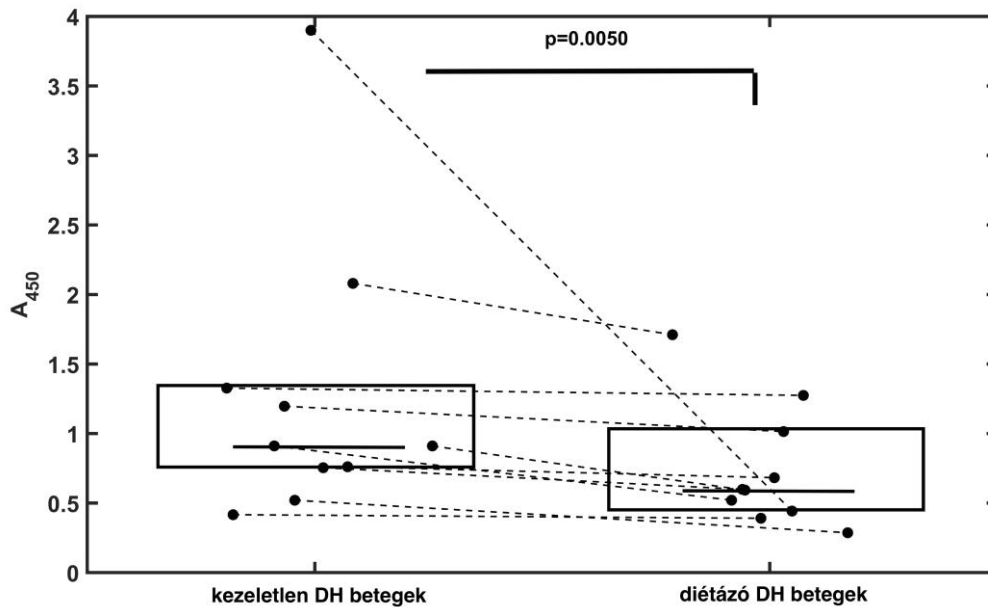
A kezeletlen DH-s betegcsoportban a TG3-IgA immunkomplex szintjei nem mutattak különbséget az anti-humán TG3 IgA ELISA pozitív ($n=22$) és negatív/szürke zóna ($n=13$) betegek között ($p=0,3747$, Mann-Whitney U teszt) (**3. táblázat**).



12. ábra. Keringő TG3-IgA ELISA abszorbancia értékek (A_{450}) kezeletlen DH-s betegek ($n=35$), egészséges kontroll személyek ($n=16$), PV-os betegek ($n=12$) és SLE-s betegek ($n=12$) esetében (multiple comparisons of mean ranks of all groups). Az értékeket személyenként 3 paralell vizsgálat adatainak átlagából számítottuk. A vonal a medián értéket, a négyzet az IQR-t jelöli.

A keringő TG3-IgA immunkomplexek glutén dependenciáját vizsgáltuk. A kezeletlen DH-s páciensek keringő TG3-IgA immunkomplex értékei szignifikánsan csökkentek GMD alatt, remisszióban (**4. táblázat**) ($p=0,0050$, Wilcoxon teszt) (**13. ábra**). Ennek ellenére néhány tünetmentes diétázó páciensnél azt tapasztaltuk, hogy az

immunkomplexek nem tűntek el teljesen, ebben az állapotban is kimutathatóak maradtak a keringésben **(4. táblázat)**.



13. ábra. Keringő TG3-IgA immunkomplex szintek (A_{450}) DH-s betegeknél ($n=10$)

kezeletlen állapotban és tünetmentesen, szigorú GMD alatt (Wilcoxon teszt). A szaggatott vonal ugyanazon beteg értékeit köti össze, az egyes értékeket személyenként 3 paralell vizsgálat adatainak átlagából számítottuk. A vonal a medián értéket, a négyzet az IQR-t jelöli.

Az anti-humán TG3 IgA ellenanyag szintek és a keringő TG3-IgA immunkomplex szintek között nem találtunk szignifikáns korrelációt sem a kezeletlen DH csoportban **(3. táblázat)** ($p=0,7222$, Spearman-féle korrelációs teszt), sem a diétázó csoportban ($p=0,4775$) **(4. táblázat)**.

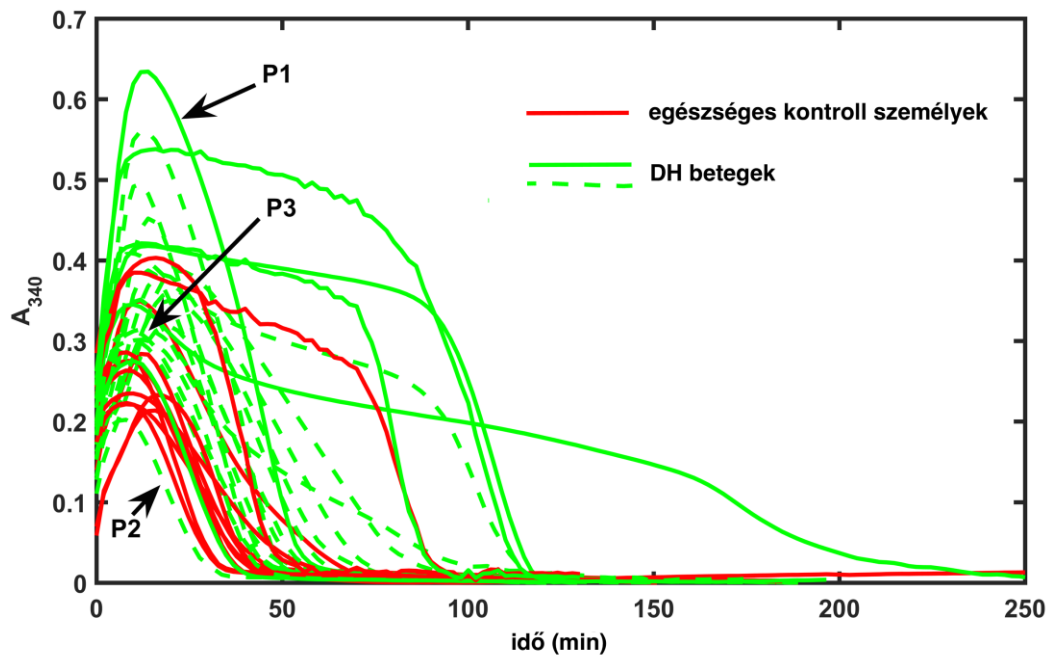
5.2. A fibrinolízis és a fibrin szerkezetének vizsgálata

5.2.1. A t-PA-katalizált turbidimetriás fibrinolízis vizsgálat és a dapson in vitro hatása

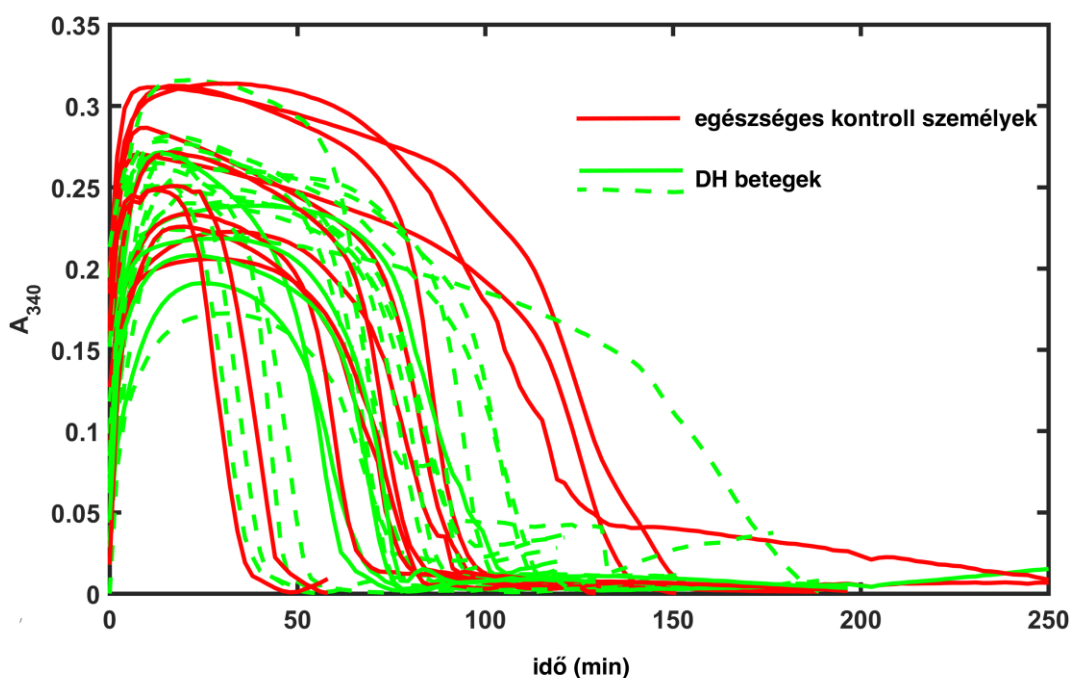
Vizsgálatunk során szisztémás tényezőket kerestünk, amelyek a DH-s betegek fibrinolitikus potenciálját befolyásolják, ezért a betegek plazmájából alvadékokat képeztünk és tPA-val indukáltuk oldásukat.

Már az ábrán is látható, hogy a beteg csoport lízis ideje megnyúlt, a maximális turbiditás meghaladja a kontroll csoport értékeit. A P1, P2 és P3 azokat a pácienseket jelöli **(5. táblázat)**, akiket a plazma lízis görbéik alapján kiválasztottunk az alvadék fibrinszerkezetének további ultrastrukturális vizsgálatához (P1 a legmagasabb, P2 a legalacsonyabb, míg P3 a kontroll csoport átlagához hasonló $A_{340\max}$ értéket mutatott) **(14. ábra)**.

Szérum minták esetében a lefutási kinetikák közötti különbségek eltűntek, a kontroll csoport lízis ideje és maximális turbiditása helyenként meghaladta a beteg csoportét **(15. ábra)**.



14. ábra. Spektrofotométerrel kapott tPA-indukált lízis görbék plazmában, a maximális turbiditás változása a lízis idő függvényében. Az alvadék kialakításának leírása a Betegek és módszer című fejezetben található. A görbék személyenként 8 paralell vizsgálat adatainak átlagából keletkeztek. A vízszintes tengely a reakció kezdete óta eltelt időt (min), míg a függőleges tengely a 340 nm-en mért abszorbanciát jelöli (A_{340}). A beteg csoporton belül a folyamatos vonal a kezeletlen, míg a szaggatott vonal a kezelt betegeket (GMD és/vagy dapson) jelöli. A görbék felszálló szára a tPA és trombin hozzáadása után elinduló alvadást jelöli, a leszálló szára a fibrinháló oldódását.

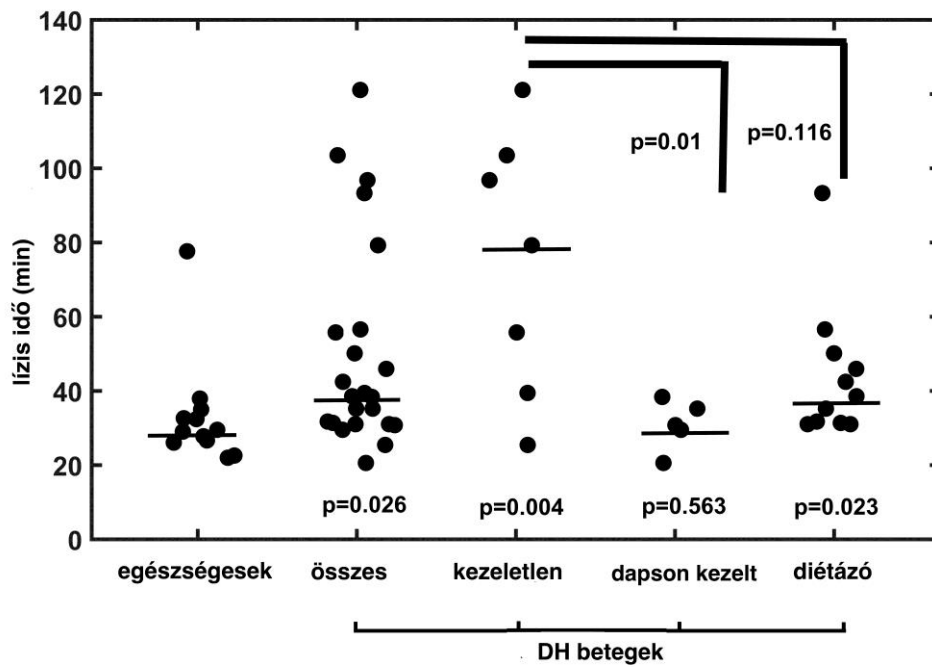


15. ábra. Spektrofotométerrel kapott tPA-indukált lízis görbék szérumban, maximális turbiditás a lízis idő függvényében. Az alvadék kialakításának leírása a Betegek és módszer című fejezetben található. A görbék személyenként 8 paralell vizsgálat adatainak átlagából keletkeztek. A vízszintes tengely a reakció kezdete óta eltelt időt (min), míg a függőleges tengely a 340 nm-en mért abszorbanciát jelöli (A_{340}). A beteg csoporton belül a folyamatos vonal a kezeletlen, míg a szaggatott vonal a kezelt betegeket (GMD és/vagy dapson) jelöli. A görbék felszálló szára a tPA és trombin hozzáadása után elinduló alvadást jelöli, a leszálló szára a fibrinháló oldódását.

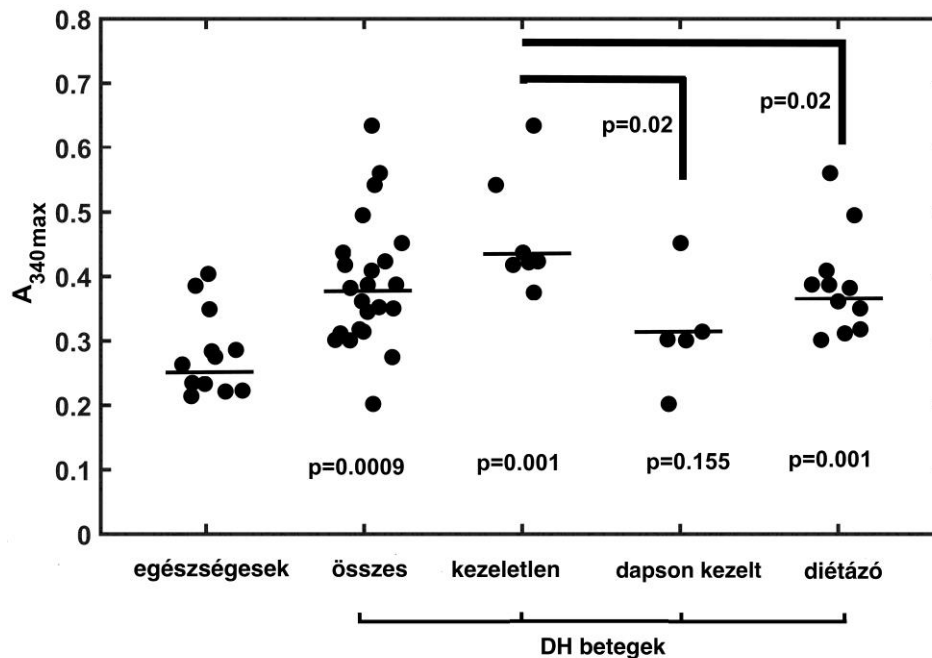
A statisztikai elemzés során a következő eredményeket kaptuk:

A plazmában mért lízis idő szignifikánsan hosszabb a kezeletlen ($n=7$) és a teljes ($n=23$) DH csoportban, mint az egészséges kontroll csoportban ($p=0,026$, $p=0,004$) (**16. ábra**).

A teljes és kezeletlen DH csoport plazmában mért $A_{340\max}$ értéke szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges kontroll csoportban ($p=0,0009$, $p=0,001$) (**17. ábra**).

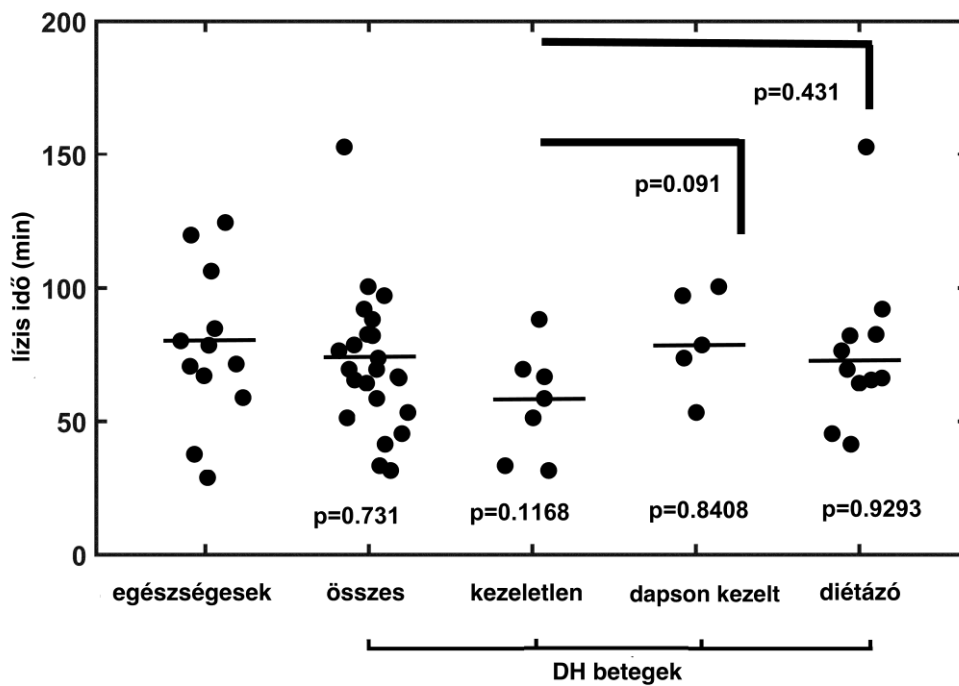


16. ábra. Plazmában mért lízis idő statisztikai elemzése (Kolmogorov-Smirnov teszt). Az adatok (fekete pontok) személyenként 8 paralell vizsgálat átlagából származnak, a vízszintes vonal az átlagot mutatja.

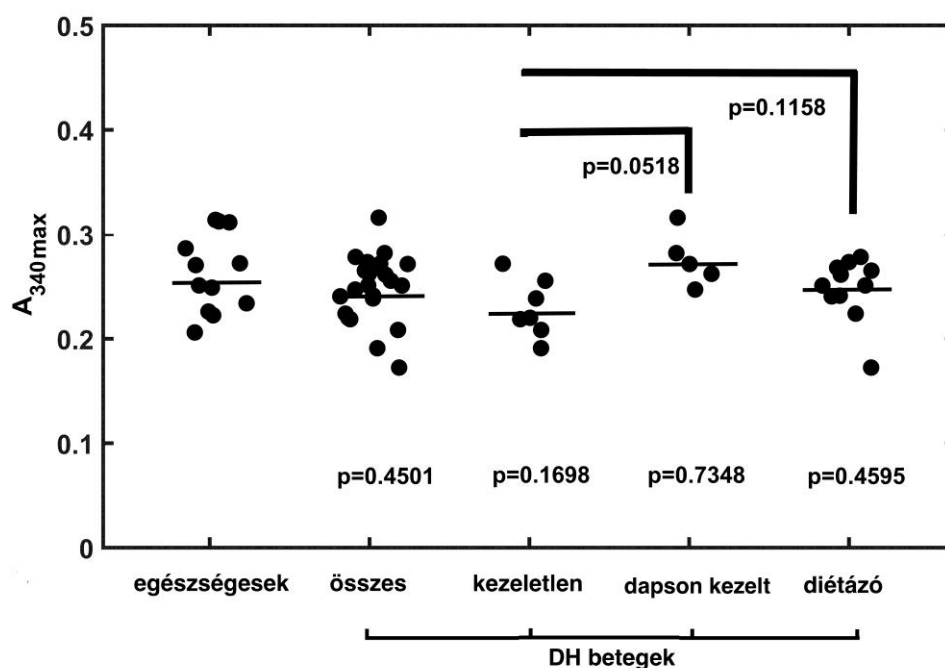


17. ábra. Plazmában mért $A_{340\max}$ statisztikai elemzése (Kolmogorov-Smirnov teszt). Az adatok (fekete pontok) személyenként 8 paralell vizsgálat átlagából származnak, a vízszintes vonal az átlagot mutatja.

A humán fibrinogénnel kiegészített szérumban sem a lízis idő (**18. ábra**), sem a turbiditás (**19. ábra**) értékek között nem találtunk különbséget a kezeletlen és a teljes DH csoportok, valamint az egészséges kontroll csoport között. A kezeletlen és a teljes DH csoport lízis ideje rövidebb, a maximális turbiditása kisebb volt, mint az egészséges kontroll csoporté. A különbséget a szérum keletkezése során eltávolított fibrinogén, valamint a hozzá kötődő anyagok okozhatják.



18. ábra. Szérumban mért lízis idő statisztikai elemzése (Kolmogorov-Smirnov teszt). Az adatok (fekete pontok) személyenként 8 paralell vizsgálat átlagából származnak, a vízszintes vonal az átlagot mutatja.



19. ábra. Szérumban mért A_{340max} statisztikai elemzése (Kolmogorov-Smirnov teszt). Az adatok (fekete pontok) személyenként 8 paralell vizsgálat átlagából származnak, a vízszintes vonal az átlagot mutatja.

A dapson kezelés alatt álló DH csoport esetében a plazmában mért lízis idő szignifikánsan rövidebb (**16. ábra**), a maximális turbiditás szignifikánsan alacsonyabb volt (**17. ábra**), mint a kezeletlen DH csoport esetében. A dapson kezelés hatására a fibrinolitikus potenciál paraméterei az egészséges kontroll csoport irányába változtak. Figyelemre méltó, hogy a GMD javította a fibrinolitikus paramétereket DH páciensek esetében, de a statisztikai különbségek továbbra is fennálltak a diétázó csoport és az egészséges kontroll csoport között a plazmában mért lízis idő és a maximális turbiditás tekintetében (**16. ábra**, **17. ábra**).

A dapson plazmában észlelt hatása eltűnt a szérumok esetében, ahol normál humán fibrinogénnel helyettesítettük a mintákból a szérum képződése során kicsapódó fibrinogént (**18. ábra**, **19. ábra**).

Mérsékelten (5-10%), de statisztikailag szignifikánsan csökkent a lízis idő, valamint a maximális turbiditás kezeletlen DH páciensek plazmájában, amikor a dapsont terápiás

dózisban közvetlenül a plazmákhoz adtuk fél órával a turbidimetriás lízis vizsgálatot megelőzően (**6. táblázat**).

6. táblázat. A dapson közvetlen hatása kezeletlen DH-s betegek (S1, S2) plazmájában mért fibrinolitikus paraméterekre (mean \pm SD, * $p < 0,05$, Kolmogorov-Smirnov teszt).

	$A_{340\max}$		Lízis idő (min)	
	Dapson nélkül	Dapson hozzáadása után	Dapson nélkül	Dapson hozzáadása után
S1	0,542 \pm 0,038	0,501* \pm 0,018	96,81 \pm 9,14	85,53* \pm 4,65
S2	0,424 \pm 0,014	0,384* \pm 0,013	79,28 \pm 3,48	75,09* \pm 2,25

Egy különálló kontroll kísérletben pemphigus vulgaris betegek (n=5) eredményeit hasonlítottuk össze egészséges kontroll személyekével (n=7). A plazmában mért lízis idő (103,1 \pm 15,64 min vs. 87,9 \pm 22,5 min), és a maximális turbiditás (0,4603 \pm 0,09 vs. 0,5688 \pm 0,0658) esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a PV csoport és az egészséges kontroll csoport között. Exogén humán fibrinogén hozzáadását követően a szérumok esetében a lízis idő és a maximális turbiditás értékek szintén nem különböztek szignifikánsan az egészséges kontroll csoporttól ($A_{340\max}$ érték 0,2551 \pm 0,024 vs. 0,253 \pm 0,008, lízis idő 56,2 \pm 15,7 min vs. 59,2 \pm 0,008 min) (**5. táblázat**).

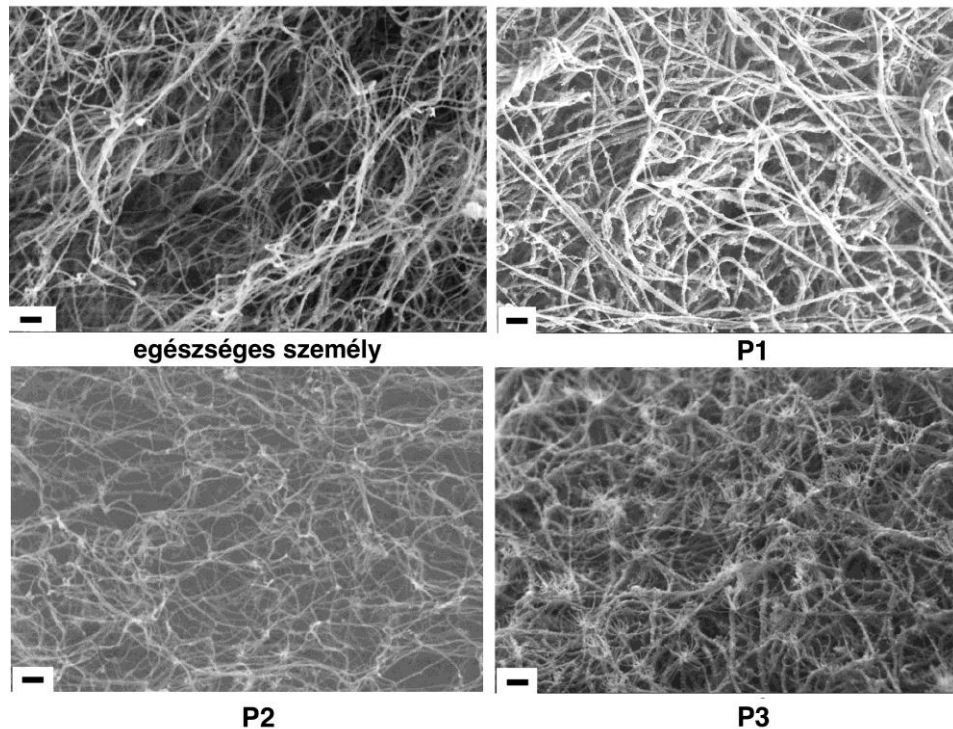
5.2.2. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat

A plazma alvadékok esetében a tPA-indukált lízis vizsgálatok során észlelt magasabb maximális turbiditás értékek ($A_{340\max}$) vagy az eltérő fibrinogén koncentrációnak, vagy a megváltozott fibrin szerkezetnek tulajdoníthatóak.

Mivel a vizsgált plazma minták fibrinogén koncentrációja a normál tartományon belül volt (1,5-4,5 g/l), pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk a fibrinszerkezet közvetlen vizsgálatához.

A plazma lízis görbék alapján összesen négy mintát választottunk ki. P1 beteg a legnagyobb maximális abszorbanciát mutatta, P2 a legalacsonyabb, P3 görbéje pedig a kontrollok között található **(14. ábra)**.

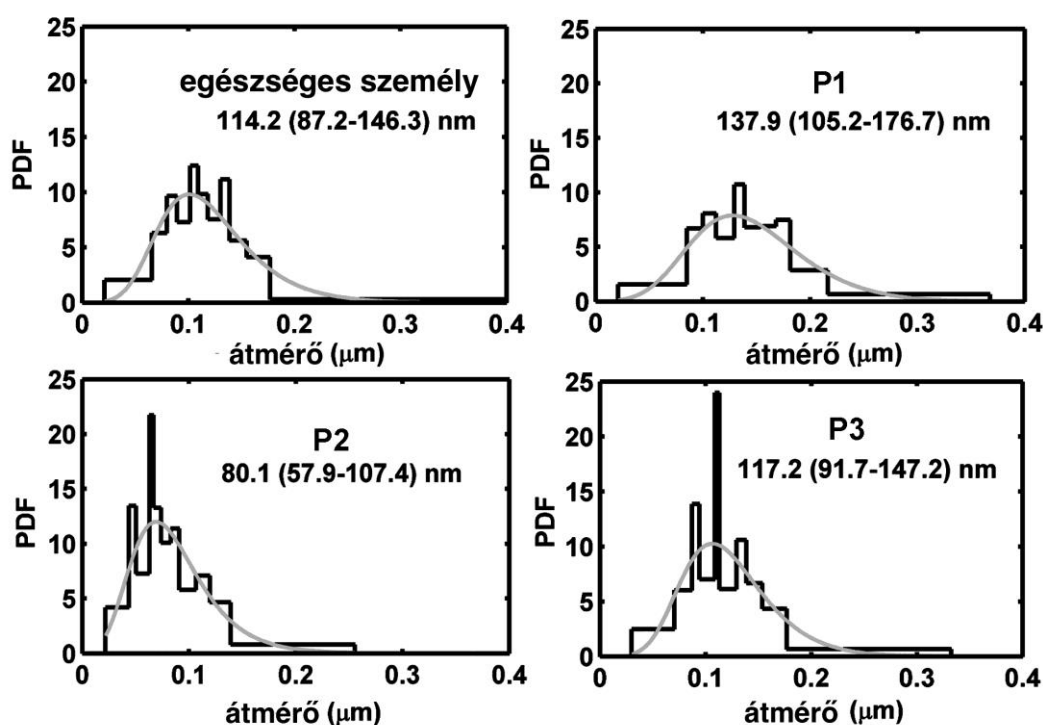
Már a pásztázó elektronmikroszkópos fotókon is jól látszik a szerkezeti különbség, a legmagasabb abszorbanciájú P1 beteg fibrinhálója szövényesebb, vastagabb szálú, még a legkisebb abszorbanciájú P2 betegé lazább szerkezetű, vékonyabb szálú **(20. ábra)**. A kezeletlen anti-TG2 IgA és anti-TG3 IgA ELISA pozitív P1 beteg fibrin szerkezete szövényesebb, a fibrin szálak átmérője vastagabb volt, mint az egészséges kontroll személyé. Az anti-TG2 IgA, anti-TG3 IgA ELISA negatív, dapson terápia és GMD alatt álló P2 beteg esetében a fibrinszálak átmérője vékonyabb volt, a fibrin szerkezet lazább volt, pórusai nagyobbak voltak, mint az egészséges kontroll esetében **(20. ábra)**.



20. ábra. SEM fotók egy egészséges kontroll személy és három DH-s beteg (P1: kezeletlen, anti-TG2 IgA és anti-TG3 IgA ELISA pozitív beteg, P2: anti-TG2 IgA, anti-TG3 IgA ELISA negatív, dapson terápia és GMD alatt álló beteg, P3: anti-TG2 IgA ELISA negatív, anti-TG3 IgA ELISA pozitív, dapsonnal kezelt beteg) fibrinhálójáról a trombin hozzáadását követően 30 perccel. Lépték = 1 μ m.

A fibrinhálók már szabad szemmel is látható szerkezeti különbségeit a plazma fibrinszálok átmérőjének további vizsgálatával számszerűen is alátámasztottuk. P1 és P2 beteg fibrinszerkezete szignifikáns eltérést mutat a kontrollhoz képest ($p < 0,001$) (**21. ábra**). Ehhez hasonló eltéréseket az eltérő fibrinogén szint is okozhat, de a minták fibrinogén szintje mind a normál tartományba esett (1,5-4,5 g/l), az eltérés minimális volt, tehát kizártuk ezen tényező hatását.

A kezeletlen P1 beteg esetében a fibrinszálok átmérőjének medián értéke (137,9 nm) szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges személynél mért medián érték (114,2 nm, $p < 0,001$). A plazma fibrinszálok a dapsonnal kezelt betegek esetében akár GMD alatt is álltak (P2), akár nem (P3), vagy még vékonyabbak voltak (P2), vagy megegyeztek (P3) a kontroll személynél vizsgált fibrinszálok átmérőivel (**21. ábra**).



21. ábra. A fibrinháló szerkezetének statisztikai elemzése (Kuiper-teszt). A vízszintes tengelyen a fibrinszálak átmérőjének eloszlása látható, a függőleges tengelyen a PDF (probability density function). (P1: kezeletlen, anti-TG2 IgA és anti-TG3 IgA ELISA pozitív beteg, P2: anti-TG2 IgA, anti-TG3 IgA ELISA negatív, dapson terápia és GMD alatt álló beteg, P3: anti-TG2 IgA ELISA negatív, anti-TG3 IgA ELISA pozitív, dapsonnal kezelt beteg).

A megfigyelt különbség megerősítéséhez egy külön vizsgálat során további két kezeletlen DH-s beteg és 2 egészséges személy fibrinszálaik átmérőit vizsgáltuk. Az újabb vizsgálat megerősítette a korábban észlelt fibrinszál vastagodást a kezeletlen DH-s betegek esetében (medián értékek a DH-s betegeknél 113,0 és 115,6 nm, egészségeseknél 74,5 és 113,0 nm).

A dapson fibrin szerkezetre gyakorolt közvetlen hatásának vizsgálatához 30 perccel az alvasztás előtt a plazma mintákat 5 $\mu\text{g/ml}$ dapsonnal inkubáltuk a terápiás koncentráció eléréséhez. A DH-s betegek és az egészséges személyek esetében is szignifikánsan csökkent a fibrinszálak átmérőinek medián értéke (58,0 – 78,8 nm).

6. Megbeszélés

A dolgozatban a DH patomechanizmusának vizsgálata során kapott eredményeinket ismertetjük. Keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatását tűztük ki célul, valamint a fibrinolitikus potenciál és a fibrin szerkezetének vizsgálatát. Utóbbit a korábban DH-ban igazolt gyakori cryofibrinogénémia²⁰⁶, a papilláris dermisben kimutatható korai fibrinogén-fibrin lerakódás^{201, 202, 204}, az akrálisan vasculitisre emlékeztető purpurák jelenléte^{103-105, 205}, valamint a sikeresen alkalmazott antikoaguláns terápia miatt tartottuk vizsgálatra érdemesnek.^{209, 211}

6.1. Keringő TG3-IgA immunkomplexek dermatitis herpetiformisban

A lisztérzékenység az elmúlt években egyre inkább a figyelem középpontjába került. A különböző immunszerológiai szűrővizsgálatok fejlődésével egyre több páciens sikerül diagnosztizálni. A dermatitis herpetiformis és a glutén szenzitív betegségek vizsgálata a patomechanizmus jobb megértése mellett új diagnosztikai eljárások és terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez is hozzájárulhat.

A DH egy krónikus hólyagos bőrbetegség, ahol a dermális papillák csúcsán lerakódó granuláris immunoglobulin A és epidermális transzglutamináz (TG3) oldhatatlan csapadékot képez. A betegek egy részénél a bőrtünetekkel párhuzamosan látens, vagy manifest GSE van jelen.¹⁰² Régóta feltételezik, hogy a papilláris IgA a bélrendszerből származik.¹⁵² 2002-ben Sárdy és munkatársai azonosították a dermális IgA autoantigénjét, a TG3-at, és leírták, hogy a TG3 és az IgA kolokalizálódik¹¹, amit később Donaldson és munkatársai is megerősítettek.¹⁶²

Míg a TG3 egérben több szövetben is kimutatható⁵⁰, a humán expressziót csak a bőrben, szőrtüszőben, vesében és különböző tumor sejtvonalakon vizsgálták^{11, 16, 51}, illetve a TG3 peptidet a keringésben is kimutattak.⁵² Ezek alapján elképzelhető, hogy a humán TG3 extracután szövetekben is megtalálható, a bélrendszerben eddig nem sikerült kimutatni.

A TG3 egészséges bőrben az epidermis legfelső rétegeiben található, és a CE és a bőrbarrier kialakításában van szerepe⁵⁹, a papillaris dermis területén nem lehet kimutatni.¹¹ A papillaris dermis területén megfigyelhető, TG3-IgA immunkomplex eredete egyelőre nem tisztázott.

A közelmúltban olyan elmélet is született, mely szerint a TG3 az epidermális keratinocytaiból származik, és az epidermisből diffundál a papillaris dermisbe a bazálmembránon keresztül, létrehozva a papillaris dermisben a DH-ra jellemző depozitumokat a keringő TG3 elleni antitestekkel.^{162, 200}

Feltételezésünk szerint keringő TG3-IgA immunkomplexek rakódnak le a dermális papillák csúcsán lévő kapillarisokban, létrehozva a subepidermális hólyagképződést, és a jellegzetes klinikai képet. Bár a DH több klinikai és patológiai jellemzője is arra utal, hogy keringő immunkomplexek szerepet játszanak a bőrtünetek kialakításában, keringő TG3-IgA immunkomplexeket korábban nem sikerült azonosítani.

A gondolat, hogy a DH egy immunkomplex betegség, már évtizedekkel ezelőtt felmerült.^{193, 226} DH esetében a klasszikus autoimmun bullosisokkal ellentétben a keringő autoantitestek nem kötődnek a bőr strukturális elemeihez, ezzel azt sugallva, hogy a keringő antitestek nem direkt a dermális ECM ellen termelődnek, és hogy a dermisben lévő IgA-TG3 aggregátumok valójában immunkomplexek.

A papillaris dermisben az IgA csapadéknak megfelelően, korábban ultrastrukturális vizsgálatokkal kimutatott amorph csomók, „DH testek” is immunkomplexek jelenlétét vetették fel.¹³² Egy korábbi vizsgálat során DH-s betegek veséjében IgA és C3 pozitív glomeruláris festődést találtak (nephropathiára utaló eltérés nem volt), ami alapján felmerült, hogy immunkomplexek jelen lehetnek a keringésben, és megakadhatnak a különböző szervekben.¹⁹⁷ De leírtak coeliákiához és DH-hoz társuló IgA nephropathiát is.¹⁹⁸

Az immunkomplex teóriát támogatta az is, hogy DH-ban és coeliákiában is leírtak korábban hypokomplementaemiát²²⁷, és DH-ban HLA-B8 hordozással összefüggő

gyengült RES funkciót találtak, ami az immunkomplex clearance zavarához vezethet.¹⁹⁹

Preisz és munkatársai a bőr vizsgálata során kezeletlen DH-s betegek 64%-ánál figyeltek meg szignifikáns érfestődést a dermisben, 92%-uknál a festődés kizárólag a papilláris dermis kis ereiben volt kimutatható, 8%-uknál subpapillárisan is találtak IgA és C3 pozitív érfestődést DIF vizsgálattal. Kettős immunfluoreszcens technikát alkalmazva az IgA és a TG3 kolokalizációját írták le a papilláris granulumokban és az érfalakban egyaránt. A dermisben sem TG2, sem TG1 festődést nem észleltek. Az eredmény egyrészt a TG3 szerepét hangsúlyozza a DH patogenezisében, a bőrtünetek kialakításában, másrészt alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint a DH patogenezisében a keringő, majd a kis erek falában lerakódó TG3-IgA immunkomplexek játszanak szerepet.¹⁹⁶

Vizsgálataink során sikerült kifejlesztenünk egy olyan szendvics ELISA módszert, ami lehetővé tette DH-ban a keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatását és szemikvantitatív meghatározását vérmintákból. Kimutattuk, hogy a TG3 ellenanyagok nem csak szabadon, hanem immunkomplexek formájában is jelen lehetnek a keringésben. Az alkalmazott módszerrel szignifikánsan magasabb TG3-IgA immunkomplex szinteket detektáltunk kezeletlen DH-s csoportban, mint az egészséges csoportban. Fontos kiemelni, hogy a TG3-IgA immunkomplex szintek sem pemphigus vulgarisban, egy klasszikus autoimmun bullosisban, sem SLE-ben, egy immunkomplex asszociált kórképben nem voltak szignifikánsan magasabbak az egészséges kontroll személyekhez képest. A kontroll csoportok között nem találtunk szignifikáns eltérést **(12. ábra)**.

Továbbá kimutattuk, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplexek szintje GMD alatt csökken, az immunkomplexek szintje glutén dependensen változik.

Glutén szenzitív enteropathiában leírnak olyan IgA antitesteket, melyek közös táplálkozási antigének, (pl.: ovalbumin, tejtermékek alkotóelemei) ellen termelődnek²²⁸,²²⁹, ezért az ELISA módszer kialakítása során vizsgáltuk, hogy a BSA blokkolás befolyásolja-e az abszorbananciát. A BSA-val blokkolt csoport értékei nem különböztek szignifikánsan attól a csoporttól, ahol a blokkolási lépést elhagytuk, ezért egyéb

aspecifikus reakciók kivédésére vizsgálataink során lege artis BSA blokkolást alkalmaztunk (**11. ábra**).

Azt tapasztaltuk, hogy néhány, diéta mellett tünetmentes DH-s betegnél is kimutathatóak maradtak az immunkomplexek (**3. táblázat**), ami nem meglepő, hiszen az IgG és IgA komplexek más immunkomplex betegségben is akár évekkel a teljes remisszió után kimutathatók maradhatnak.²³⁰ Az ellenanyag és az immunkomplex szintje nem feltétlenül korrelál egymással, keringő TG3-IgA immunkomplexek olyan pácienseknél is detektáltunk, akik a közforgalomban lévő TG3 elleni IgA ELISA-val szeronegatívak voltak (**3. táblázat**). Az új szendvics ELISA módszernek a DH diagnosztikájában is jelentősége lehet azoknál a pácienseknél, akik anti-TG3 IgA ellenanyag negatívak, és csak TG3-IgA immunkomplexeket lehet kimutatni a keringésükben. További glutén szenzitív betegségekben is fontos lenne az immunkomplexek vizsgálata (coeliákia, glutén szenzitív neuropathia/ataxia).

Sárdy és munkatársai korábban azt is kimutatták, hogy bár coeliákiában is jelen vannak TG3 elleni antitestek, DH-ban az antitestek nagy aviditásúak és affinitásúak. A TG2 és a TG3 szignifikáns homológiát mutat, főleg az ezimatikailag aktív doménben, így keresztreakció kialakulása a két molekula ellenanyagaival nem meglepő.¹¹

A TG2 azon képessége, hogy a glutént megkösse, majd a gliadin frakcióját deamidálja, elengedhetetlen a TG2 elleni antitestek termelődéséhez. A TG3 ugyanezt kevésbé effektíven végzi, ez lehet az eltérő autoantitest válasz oka.²³¹ Még mindig nem tisztázott, hogy a nagy affinitású és aviditású TG3 antitestek epitóp spreading mechanizmus következtében, vagy direkt a TG3 antigén ellen termelődnek, hiszen a TG3-at a bélben még nem sikerült kimutatni.¹⁹⁵

A TG2, a TG3 és a TG6 génje is a 20-as kromoszómán található. Mindhárom fehérje a glutén-indukálta autoimmunitás célfehérjéje lehet IgA típusú autoantitestek képződésén keresztül, melyek coeliákia esetében a bélben (TG2), DH esetében a bőrben (TG3), glutén ataxia/neuropathia esetén a KIR-ben rakódnak le (TG6). Továbbá mindhárom enzim képes kötni és deamidálni a gliadint, bár eltérő specificitással.²³¹

Érdekes, hogy a TG3 és az IgA tünetmentes betegeknél évekkel a GMD után is kimutatható a bőrben.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Ennek oka valószínűleg az immunkomplex szoros kötődése az extracelluláris mátrixhoz a papillaris dermisben. Taylor és munkatársai a közelmúltban publikálták, hogy a TG3 megőrzi enzimátikus aktivitását a dermális immunkomplexen belül, ami magyarázza a hosszú ideig megmaradó, irreverzibilisen kötött IgA precipitátumot a bőrben.¹⁶⁶ Ismételt glutén fogyasztás mellett az IgA precipitátum újra, egy éven belül megjelenhet.¹⁸⁴

Habár a kóros IgA festődést tünetmentes DH-s bőrterületen is ki lehet mutatni, mégis típusos predilekciós helyeken jönnek létre a klinikai tünetek, ezért azt feltételezzük, hogy a tünetek kialakulásához egyéb helyi tényezők is szükségesek.¹⁶² Elképzelhető, hogy a TG3 mechanikai hatásra aktiválódik, hasonlóan, mint a TG2 az érfalban.²³² Ez fibrinogén felszabaduláshoz¹⁶⁶, alvadási faktorok és gyulladásos fehérjék akkumulációjához vezethet, létrehozva a klinikai tüneteket.^{204, 233}

Ma elfogadott, hogy sokszor a nem is diagnosztizált, látens, szubklinikus coeliákia a DH kialakulásának bázisa. Ezt alátámasztja az a finn prospektív vizsgálat, mely során kezeletlen, vagy diétázó coeliákiás betegeket követtek, és a követés során a betegek 4%-ánál DH alakult ki, főként olyan betegeknél, akik a GMD-t nem tartották be megfelelően.²³⁴ Emellett szól az is, hogy a DH incidenciája a 90-es évektől folyamatosan csökken, ezzel párhuzamosan a coeliákia incidencia jelentősen nő, melynek oka a coeliákia korai, sokszor látens/szubklinikus/néma stádiumban történő felismerése, így a DH kialakulásának lehetősége kisebb.¹¹⁵ Gyermekkorban a DH rendkívül ritka, és a TG3 antitest titer meglehetősen alacsony.¹⁷¹

A keringő immunkomplexek jelenlétének vizsgálata nem egyszerű. Bár egyéb technikák is rendelkezésre állnak, mint például immunprecipitáció vagy immunoblot különböző TG3 és TG2 ellenanyagokat felhasználásával, a transzglutamináz immunkomplexek kimutatása glutén szenzitív betegségekben, itt DH-ban, újdonság. Az újonnan kifejlesztett ELISA technikának diagnosztikai jelentősége is lehet olyan TG2 és TG3 ellenanyag negatív kezeletlen, vagy kezelt DH páciensek esetében, akiknél azonban a keringő TG3-IgA immunkomplexeket ki lehet mutatni. Az, hogy a TG3-IgA

immunkomplexek hol keletkeznek, és hogyan kerülnek a keringésbe továbbra is kérdéses, ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A DH patomechanizmusában a TG3 autoimmunitás kialakulása valószínűleg a TG2 és a TG3 közötti epitope spreading mechanizmus útján néhány coeliákiás páciensnél keringő TG3-IgA immunkomplexek kialakulásához vezet, létrehozva a jellegzetes klinikai tüneteket, de a glutén-indukált közvetlen TG3 autoimmunitás sem kizárható.

6.2. A fibrinolitikus potenciál és a fibrin szerkezeti vizsgálata

Vizsgálataink során DH-s betegek plazma és szérum mintáit elemeztük a fibrinháló keletkezési és oldódási képessége szempontjából, és csökkent fibrinolitikus potenciált észleltünk, ami legalább részben a pásztázó elektronmikroszkópiával igazolt megváltozott fibrinszerkezettel magyarázható. A fibrinolitikus eltérések a DH-ban tüneti terápiaként alkalmazott dapson hatására in vitro mérsékelten, de szignifikáns mértékben javultak, reverzibilisek voltak.

Egy korábbi megfigyelésünk alapján, mely szerint kezeletlen DH-s páciensek plazmájában váratlanul magas a cyrofibrinogénémia előfordulása²⁰⁶, patológiás fibrinogén-fibrin átalakulást, illetve fibrinolízist feltételeztünk. A fibrinolízis vizsgálatát azért is tartottuk indokoltnak, mert több kutatócsoport is kimutatott extravasculáris fibrinogén-fibrin depozitumokat a papillaris dermis területén az IgA precipitátumnak megfelelő lokalizációban, melyek jellemzőek a kórképre, és már a hólyagképződés korai stádiumában, az IgA és a neutrophil microabscessus megjelenése előtt kimutathatóak.²⁰¹⁻²⁰⁴

Korábban in vivo autológ szérum beadásával létre tudták hozni a DH-ra jellemző bőrtüneteket, ugyanez heparinnal, vagy ϵ -aminokapronsavval előkezelt plazmával már nem volt provokálható.²⁰⁸ Néhány korábbi tanulmányban beszámolnak arról, hogy a heparin kezelés önmagában, és egyéb szerekekkel kombinálva is hatásos súlyos, disszeminált dermatitis herpetiformisban szenvedő pácienseknél.^{209, 210} A terápiás hatás mögötti pontos mechanizmus ismeretlen maradt.

Vizsgálatunk során a fibrin kialakulását, szerkezetét és a lízissel szembeni ellenállóságát elemeztük DH-s betegeknél (kezeletlen, vagy diétázó és/vagy dapsonnal kezelt pácienseknél egyaránt). A tPA-indukálta turbiditás alapú fibrinolízis vizsgálat a fibrin keletkezésének és lebontásának kinetikájáról, valamint a fibrin szerkezetéről ad információt. A vizsgált plazma és szérum minták a folyamathoz szükséges saját, esszenciális komponensei (fibrinogén a járulékos plazma proteinnel, proteáz inhibitorokkal, plazminogénnel) endogén eredetűek voltak. Exogén forrásból kizárólag az alvadás és a lízis legfőbb triggerit, a trombint és a tPA-t adtuk hozzá a rendszerhez, ezáltal az eredmények a plazma globális fibrinolitikus potenciálját jellemzik.

A plazmában mért lízis idők medián értékei kezeletlen DH-s betegeknél több, mint háromszor hosszabbak voltak, mint az egészségeseknél mért értékek, mely egyértelműen csökkent fibrinolitikus potenciált jelez. A vizsgálat során kapott másik adat (maximális turbiditás, $A_{340\text{max}}$) a fibrin szerkezetét jellemző paraméter.^{222, 223} Ezen értékek majdnem kétszeres növekedését figyeltük meg kezeletlen DH-s betegek plazmájában, ami megváltozott fibrinszerkezetre utalt, ez utóbbit pásztázó elektronmikroszkópiával sikerült igazolnunk. Pásztázó elektronmikroszkópiával vastagabb átmérőjű fibrinrostokat igazoltunk kezeletlen DH-s betegeknél (**20. ábra**). A fibrinszerkezet változása önmagában is megnövekedett fibrinolitikus rezisztenciát, csökkent fibrinolitikus potenciált eredményezhet, hasonlóan a neutrophil granulocyták DNS és hiszton kibocsátásához, melyet Kolev és munkatársai a közelmúltban publikáltak, és ami szintén a fibrinszálak megvastagodását okozza, illetve gátolja a tPA-indukálta fibrinolízist. A DH-ban észlelt változások leginkább a neutrophil granulocyták hiszton hatására hasonlítanak.^{215, 235}

A fibrin szerkezetet és a fibrinolitikus potenciált pemphigus vulgarisban, egy klasszikus autoimmun bullosisban szenvedő páciensek plazma mintáiban is megvizsgáltuk, de a DH-ban jellemző eltéréseket nem észleltük, a fibrinolitikus potenciál nem különbözött szignifikánsan az egészséges kontroll csoportban kapott értékektől. Ez természetesen nem zárja ki, hogy hasonló fibrinolitikus eltérések más autoimmun bullosisok esetében is fennállhatnak.

Amikor a plazmában az alvadék kialakul, a fibrinogén asszociált proteinek széles spektruma beépül, ezáltal az alvadék részét képezi.²³⁶ A magas prevalenciájú cryofibrinogenaemia DH-ban²⁰⁶ felveti annak a lehetőségét, hogy a megváltozott fibrinszerkezet és a fibrinolitikus profil háttérében egy, a keringő fibrinogénhez kötődő faktor áll. A hipotézisünket alátámasztják azok az eredmények, amelyeket a plazma mintákkal egyidőben levett szérum minták vizsgálata során kaptunk. Ekkor a betegek saját fibrinogénjét (és a hozzá kötődő proteineket) eltávolítottuk a rendszerből, majd tisztított humán fibrinogénnel helyettesítettük. Ezekben az esetekben a DH-s betegek alvadékainak fibrinolitikus tulajdonságai már nem különböztek az egészséges kontroll személyekétől **(15., 18., 19. ábra)**.

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a csökkent fibrinolitikus potenciál és a megváltozott fibrin szerkezet szerepet játszhat a DH patomechanizmusában, a bőrtünetek kialakításában, alátámasztva azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek a haemosztázis egyensúlyának felborulását összefüggésbe hozták a bőrtünetek megjelenésével. Ezek az adatok a korábban sikeresen alkalmazott antikoagulálás terápia hatékonyságának háttérére is rávilágíthatnak.

DH-ban a leggyakrabban használt szisztémás tüneti terápia a dapson. A fibrinolízisre és a fibrin szerkezetre gyakorolt kedvező hatása, amit vizsgálataink során igazoltunk, egy új terápiás aspektust jelenthet az eddig feltételezett hatásmechanizmusok mellett.¹⁹¹ Emellett magyarázná a dapson terápiás hatékonyságát a különböző cryofibrinogenaemia asszociált kórképekben²³⁷ és a különböző vasculitis formákban.²³⁸

A megváltozott fibrinolitikus folyamatok egyéb autoimmun hólyagos kórképek esetében is ismertek, aktív bullosus pemphigoidban szintén csökkent fibrinolitikus potenciált mutattak ki, ami szisztémás kortikoszteroid kezelés mellett normalizálódott.²³⁹ DH pácienseknél korábban szignifikánsan alacsonyabb urokináz plazminogén aktivátor, plazminogén szintet, antiplazmin aktivitást és magasabb plazminogén aktivátor inhibitor-1 és plazmin- α_2 -antiplazmin komplex szinteket találtak plazmában.²⁴⁰ A fibrinolitikus faktorok szintjének változása (emelkedett PAI-1, alacsonyabb plazminogén) valószínűleg a fennálló gyulladásnak köszönhető, és ezek a

változások szintén csökkent fibrinolízishez vezethetnek a megváltozott fibrinszerkezet litikus következményei mellett.

Airola és munkatársai DH-s bőrben a hólyagképződésnek megfelelő lokalizációban a mátrix metalloproteázok mellett fokozott urokináz plazminogén aktivátor mRNS expressziót írtak le a bazális keratinocytákban.²⁴¹ A csökkent szisztémás fibrinolitikus háttér mellett az urokináz lokális kifejeződése alternatív célpontok felé tereli a plazmin rendszert, a metalloproteázok aktiválásán keresztül az ECM gyulladásos átalakulását eredményezheti.²⁴²

Összefoglalásként elmondható, hogy csökkent fibrinolitikus potenciált és megváltozott fibrin szerkezetet észleltünk kezeletlen DH-s betegeknél. A kimutatott változások dapson hatására részben reverzibilisek voltak. Az aktív, tünetes pácienseknél észlelt szerkezeti és fibrinolitikus eltérések, melyek tünetmentes állapotban nem voltak jelen, arra utalnak, hogy a fibrin(ogén) turnover szerepet játszik a DH patomechanizmusában. A fibrin és a cryofibrinogén szerepének további vizsgálata a bőrtünetek kialakításában új terápiás utakat jelezhet DH-ban.

7. Következtetések

1. Elsőként azonosítottunk keringő TG3-IgA immunkomplexeket egy saját fejlesztésű szemikvantitatív ELISA módszer segítségével DH-ban, ami alátámasztja a hipotézisünket, mely szerint a DH egy immunkomplex betegség, ahol a keringő, majd a dermális papillák csúcsán precipitálódó TG3-IgA immunkomplexek felelősek a bőrtünetek kialakításáért.

2. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy az anti-TG3 IgA ellenanyag szintek és a keringő TG3-IgA immunkomplex értékek nem mutatnak szignifikáns korrelációt sem a kezeletlen DH csoportban, sem GMD alatt, értékük ugyanannál a betegnél különböző lehet. A keringő TG3-IgA immunkomplex mennyisége szignifikánsan csökken remisszióban, GMD mellett, és szintje glutén dependensen változik. A TG3-IgA immunkomplexek jelen lehetnek a keringésben olyan esetben is, amikor keringő TG3 ellenanyag nem mutatható ki.

3. Kezeletlen DH-s betegek plazma alvadékaiban a tPA-indukálta lízis szignifikánsan lassabb volt egészséges kontroll csoporthoz képest, azaz csökkent fibrinolitikus potenciált, gátolt szisztémás fibrinolízist igazoltunk.

4. A csökkent fibrinolitikus potenciál legalább részben a pásztázó elektronmikroszkópiával igazolt megváltozott fibrin szerkezetre vezethető vissza.

5. A dapson in vitro kis mértékben, de szignifikánsan javította a fibrinolitikus potenciált és a fibrin szerkezetét, hatására az egészségesekhez hasonló értékeket kaptunk. Ez a hatás hozzájárulhat a terápia hatékonyságához.

8. Összefoglalás

A dermatitis herpetiformis (DH) egy autoimmun hólyagos kórkép, ami látens, vagy néma glutén szenzitív enteropathiához társul. A dermális papillák csúcsán lerakódó IgA-TG3 precipitátum jellemzi, mely a bőrben oldhatatlan csapadékot képez. A TG3 az epidermis legfelső részében expresszálódik, és a papilláris dermisben egészséges bőrben nem fordul elő. A papilláris TG3-IgA eredete DH-ban a mai napig tisztázatlan. Bár számos adat szól amellett, hogy a DH egy immunkomplex betegség, a kórképben mindeddig keringő TG3-IgA immunkomplexeket nem sikerült azonosítani. Vizsgálatunk során célul tűztük ki keringő TG3-IgA immunkomplexek kimutatását egy saját fejlesztésű szemikvantitatív ELISA módszer segítségével. Elsőként azonosítottunk keringő TG3-IgA immunkomplexeket DH-ban, ami alátámasztja a hipotézisünket, mely szerint a DH egy olyan glutén indukálta autoimmun hólyagos betegség, ahol a keringő, majd a dermális papillák csúcsán precipitálódó TG3-IgA immunkomplexek felelősek a bőrtünetek kialakításáért. Az anti-TG3 IgA ellenanyag szintek és a keringő TG3-IgA immunkomplex értékek között nem találtunk szignifikáns korrelációt. Igazoltuk, hogy a keringő TG3-IgA immunkomplex mennyisége glutén dependensen változik és jelen lehet a keringésben olyan esetben is, amikor keringő TG3 ellenanyag nem mutatható ki. A közelmúltban magas prevalenciájú cryofibrinogenaemiát igazoltunk kezeletlen DH-s betegeknél, valamint régóta ismert, hogy a dermális IgA-TG3 precipitátum kolokalizálódik fibrinnel és fibrinogénnel. Mindezek, valamint a klinikai tünetek (acralis purpurák) alapján a patomechanizmus további vizsgálata során célul tűztük ki a fibrinolitikus potenciál és a fibrin szerkezetének vizsgálatát. A kezeletlen DH-s betegeknél szignifikánsan hosszabb lízis időt, és magasabb maximális turbiditást, csökkent fibrinolitikus potenciált igazoltunk turbidimetriás lízis vizsgálattal, ami részben a megváltozott fibrin szerkezettel függ össze, amit pásztázó elektronmikroszkópiával igazoltunk. A dapson kedvezően befolyásolta a megváltozott fibrin szerkezetet és fibrinolitikus kapacitást és ez a hatás része lehet terápiás hatékonyságának. Az aktív, tünetes pácienseknél észlelt fibrinolitikus plazma eltérések, és ezzel párhuzamosan a terápia mellett, tünetmentes állapotban észlelt reverzibilis szerkezeti és fibrinolitikus paraméterek arra utalnak, hogy a fibrin(ogén) turnover szerepet játszik a DH patomechanizmusában.

9. Summary

Dermatitis herpetiformis (DH) is an autoimmune blistering disease, which develops in a subpopulation of patients with silent or latent gluten sensitive enteropathy. It is characterized by IgA and TG3 deposition in the papillary dermis, where IgA and TG3 together form insoluble aggregates. TG3 is expressed in the uppermost epidermis but it was not detected in the normal papillary dermis. The origin of papillary TG3-IgA deposits in DH skin is still unclear. Although several data indicate the role of immune complexes in the cutaneous pathology, circulating TG3-IgA immune complexes were never identified in patients with DH. In this study, our aim was to detect circulating TG3-IgA immune complexes in DH. We developed a sandwich ELISA that made detection and semi-quantification of TG3-IgA immune complexes possible, that support our hypothesis that DH is a gluten induced autoimmune blistering disease, where circulating and precipitated TG3-IgA immune complexes in the papillary dermis are responsible for the development of skin symptoms. We did not find a significant correlation between the anti-TG3 antibody levels and the TG3-IgA immune complex values. We proved that the level of the TG3-IgA immune complexes are affected by gluten and can be present in the circulation in the absence of TG3 antibodies.

Recently, we observed a high prevalence of cryofibrinogenaemia in plasma of untreated DH patients, and the IgA and TG3 deposits in the papillary dermis were found to co-localize with fibrin and fibrinogen. Based on these data and the clinical symptoms (acral purpura) we decided to investigate the fibrinolytic potential and the fibrin structure in DH. We found a significantly prolonged lysis time and a higher maximal turbidity, a decreased fibrinolytic profile by a turbidimetric lysis assay in untreated DH patients, which is partly linked to the altered fibrin structure demonstrated by scanning electron microscopy. We could confirmed that dapsone drug had a favorable effect to the modified clot structure and fibrinolytic profile, and we proposed that this could be part of its therapeutic potential. The association of active symptomatic skin disease with fibrinolytic abnormalities in plasma and the parallel normalization of skin symptoms and clot properties under efficient therapy suggest that fibrin(ogen) turnover is involved in the pathomechanism of DH.

10. Irodalomjegyzék

1. L. D. Dermatitis herpetiformis. (1884) JAMA, 225-228.
2. Fry L. (2002) Dermatitis herpetiformis: problems, progress and prospects. Eur J Dermatol, 12: 523-531.
3. van der Meer JB. (1969) Granular deposits of immunoglobulins in the skin of patients with dermatitis herpetiformis. An immunofluorescent study. Br J Dermatol, 81: 493-503.
4. Beninati S, Facchiano F, Piacentini M. (2013) Transglutaminases: future perspectives. Amino Acids, 44: 1-9.
5. Sarkar NK, Clarke DD, Waelsch H. (1957) An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. Biochim Biophys Acta, 25: 451-452.
6. Folk JE, Cole PW. (1966) Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. J Biol Chem, 241: 5518-5525.
7. Folk JE, Finlayson JS. (1977) The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. Adv Protein Chem, 31: 1-133.
8. Lorand L, Graham RM. (2003) Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Nat Rev Mol Cell Biol, 4: 140-156.
9. Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GV, Mehta K. (2014) Transglutaminase regulation of cell function. Physiol Rev, 94: 383-417.

10. Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D. (2001) Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J Biol Chem*, 276: 33066-33078.
11. Sardy M, Karpati S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. (2002) Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*, 195: 747-757.
12. Candi E, Oddi S, Paradisi A, Terrinoni A, Ranalli M, Teofoli P, Citro G, Scarpato S, Puddu P, Melino G. (2002) Expression of transglutaminase 5 in normal and pathologic human epidermis. *J Invest Dermatol*, 119: 670-677.
13. Candi E, Schmidt R, Melino G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 328-340.
14. Thibaut S, Candi E, Pietroni V, Melino G, Schmidt R, Bernard BA. (2005) Transglutaminase 5 expression in human hair follicle. *J Invest Dermatol*, 125: 581-585.
15. Akiyama M, Matsuo I, Shimizu H. (2002) Formation of cornified cell envelope in human hair follicle development. *Br J Dermatol*, 146: 968-976.
16. Thibaut S, Cavusoglu N, de Becker E, Zerbib F, Bednarczyk A, Schaeffer C, van Dorsselaer A, Bernard BA. (2009) Transglutaminase-3 enzyme: a putative actor in human hair shaft scaffolding? *J Invest Dermatol*, 129: 449-459.
17. Mócsai Gábor MLD, Remenyik Éva Dr, Szegedi Andrea Dr. (2012) A bőr barrier felépítése, különös tekintettel a keratinocytákra és a sejtközi kapcsolatokra – Az atopiás dermatitis kialakulásában játszott szerepük *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle*, 88: 72–76.

18. S. K. (2013) Transglutaminases in cutaneous barrier formation and environmentally induced allergic and immunological skin diseases. *Allergo Journal*, 22: 550-552.
19. Nemes Z, Marekov LN, Fesus L, Steinert PM. (1999) A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 8402-8407.
20. Nemes Z, Steinert PM. (1999) Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*, 31: 5-19.
21. Steinert PM, Chung SI, Kim SY. (1996) Inactive zymogen and highly active proteolytically processed membrane-bound forms of the transglutaminase 1 enzyme in human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 221: 101-106.
22. Steinert PM, Kim SY, Chung SI, Marekov LN. (1996) The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*, 271: 26242-26250.
23. Phillips MA, Qin Q, Mehrpouyan M, Rice RH. (1993) Keratinocyte transglutaminase membrane anchorage: analysis of site-directed mutants. *Biochemistry*, 32: 11057-11063.
24. Eckert RL, Sturniolo MT, Jans R, Kraft CA, Jiang H, Rorke EA. (2009) TIG3: a regulator of type I transglutaminase activity in epidermis. *Amino Acids*, 36: 739-746.
25. Kim SY, Grant P, Lee JH, Pant HC, Steinert PM. (1999) Differential expression of multiple transglutaminases in human brain. Increased expression and cross-linking by transglutaminases 1 and 2 in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 274: 30715-30721.

26. Martinet N, Bonnard L, Regnault V, Picard E, Burke L, Siat J, Grosdidier G, Martinet Y, Vignaud JM. (2003) In vivo transglutaminase type 1 expression in normal lung, preinvasive bronchial lesions, and lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28: 428-435.
27. Baumgartner W, Golenhofen N, Weth A, Hiiragi T, Saint R, Griffin M, Drenckhahn D. (2004) Role of transglutaminase 1 in stabilisation of intercellular junctions of the vascular endothelium. *Histochem Cell Biol*, 122: 17-25.
28. Russell LJ, DiGiovanna JJ, Hashem N, Compton JG, Bale SJ. (1994) Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q. *Am J Hum Genet*, 55: 1146-1152.
29. Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SP, Ponc M, Bon A, Lautenschlager S, Schorderet DF, Hohl D. (1995) Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*, 267: 525-528.
30. Becker K, Csikos M, Sardy M, Szalai ZS, Horvath A, Karpati S. (2003) Identification of two novel nonsense mutations in the transglutaminase 1 gene in a Hungarian patient with congenital ichthyosiform erythroderma. *Exp Dermatol*, 12: 324-329.
31. Credille KM, Minor JS, Barnhart KF, Lee E, Cox ML, Tucker KA, Diegel KL, Venta PJ, Hohl D, Huber M, Dunstan RW. (2009) Transglutaminase 1-deficient recessive lamellar ichthyosis associated with a LINE-1 insertion in Jack Russell terrier dogs. *Br J Dermatol*, 161: 265-272.

32. Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H, Hashida M, Iizuka H, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Kinoshita T, Takeda J, Yamanishi K. (1998) Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1044-1049.
33. Kuramoto N, Takizawa T, Takizawa T, Matsuki M, Morioka H, Robinson JM, Yamanishi K. (2002) Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1. *J Clin Invest*, 109: 243-250.
34. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. (2009) Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev*, 89: 991-1023.
35. Szondy Z, Sarang Z, Molnar P, Nemeth T, Piacentini M, Mastroberardino PG, Falasca L, Aeschlimann D, Kovacs J, Kiss I, Szegezdi E, Lakos G, Rajnavolgyi E, Birckbichler PJ, Melino G, Fesus L. (2003) Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7812-7817.
36. Tong L, Png E, Aihua H, Yong SS, Yeo HL, Riau A, Mendoz E, Chaurasia SS, Lim CT, Yiu TW, Iismaa SE. (2013) Molecular mechanism of transglutaminase-2 in corneal epithelial migration and adhesion. *Biochim Biophys Acta*, 1833: 1304-1315.
37. Oh K, Park HB, Seo MW, Byoun OJ, Lee DS. (2012) Transglutaminase 2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis through positive regulation of encephalitogenic T cell differentiation and inflammation. *Clin Immunol*, 145: 122-132.

38. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 3: 797-801.
39. Chung SI, Folk JE. (1972) Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified enzyme). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69: 303-307.
40. Kim IG, Lee SC, Lee JH, Yang JM, Chung SI, Steinert PM. (1994) Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family. *J Invest Dermatol*, 103: 137-142.
41. Kim IG, Gorman JJ, Park SC, Chung SI, Steinert PM. (1993) The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse. *J Biol Chem*, 268: 12682-12690.
42. Cheng T, Hitomi K, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, Yamamoto K, Nishi K, Watts C, Reinheckel T, Schalkwijk J, Zeeuwen PL. (2006) Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem*, 281: 15893-15899.
43. Zeeuwen PL, Cheng T, Schalkwijk J. (2009) The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol*, 129: 1327-1338.
44. Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM, Rastinejad F. (2004) Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem*, 279: 7180-7192.
45. Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM. (2003) Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem*, 278: 23834-23841.

46. Ahvazi B, Kim HC, Kee SH, Nemes Z, Steinert PM. (2002) Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *Embo j*, 21: 2055-2067.
47. Hitomi K, Presland RB, Nakayama T, Fleckman P, Dale BA, Maki M. (2003) Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J Dermatol Sci*, 32: 95-103.
48. Yamane A, Fukui M, Sugimura Y, Itoh M, Alea MP, Thomas V, El Alaoui S, Akiyama M, Hitomi K. (2010) Identification of a preferred substrate peptide for transglutaminase 3 and detection of in situ activity in skin and hair follicles. *Febs j*, 277: 3564-3574.
49. Steinert PM, Parry DA, Marekov LN. (2003) Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J Biol Chem*, 278: 41409-41419.
50. Hitomi K, Horio Y, Ikura K, Yamanishi K, Maki M. (2001) Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 33: 491-498.
51. Wu X, Cao W, Wang X, Zhang J, Lv Z, Qin X, Wu Y, Chen W. (2013) TGM3, a candidate tumor suppressor gene, contributes to human head and neck cancer. *Mol Cancer*, 12: 151.
52. Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG. (2002) Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 1: 947-955.

53. Brennan BM, Huynh MT, Rabah MA, Shaw HE, Bisailon JJ, Radden LA, 2nd, Nguyen TV, King TR. (2015) The mouse wellhaarig (we) mutations result from defects in epidermal-type transglutaminase 3 (Tgm3). *Mol Genet Metab*, 116: 187-191.
54. FB UB, Cau L, Tafazzoli A, Mechin MC, Wolf S, Romano MT, Valentin F, Wiegmann H, Huchenq A, Kandil R, Garcia Bartels N, Kilic A, George S, Ralser DJ, Bergner S, Ferguson DJ, Oprisoreanu AM, Wehner M, Thiele H, Altmuller J, Nurnberg P, Swan D, Houniet D, Buchner A, Weibel L, Wagner N, Grimalt R, Bygum A, Serre G, Blume-Peytavi U, Sprecher E, Schoch S, Oji V, Hamm H, Farrant P, Simon M, Betz RC. (2016) Mutations in Three Genes Encoding Proteins Involved in Hair Shaft Formation Cause Uncombable Hair Syndrome. *Am J Hum Genet*, 99: 1292-1304.
55. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, Saito S, Nagino M, Hirohashi S, Kondo T. (2009) Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. *Int J Cancer*, 124: 2106-2115.
56. Gao H, Wang L, Cui S, Wang M. (2012) Combination of meta-analysis and graph clustering to identify prognostic markers of ESCC. *Genet Mol Biol*, 35: 530-537.
57. Stacey SN, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasdottir A, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, Masson G, Gudmundsson J, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Fuentelsaz V, Corredera C, Grasa M, Planelles D, Sanmartin O, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Hemminki K, Nexo BA, Tjonneland A, Overvad K, Johannsdottir H, Helgadottir HT, Thorsteinsdottir U, Kong A, Vogel U, Kumar R, Nagore E, Mayordomo JI, Rafnar T, Olafsson JH, Stefansson K. (2014) Germline sequence variants in TGM3 and RGS22 confer risk of basal cell carcinoma. *Hum Mol Genet*, 23: 3045-3053.

58. John S, Thiebach L, Frie C, Mokkaapati S, Bechtel M, Nischt R, Rosser-Davies S, Paulsson M, Smyth N. (2012) Epidermal transglutaminase (TGase 3) is required for proper hair development, but not the formation of the epidermal barrier. *PLoS One*, 7: e34252.
59. Bogнар P, Nemeth I, Mayer B, Haluszka D, Wikonkal N, Ostorhazi E, John S, Paulsson M, Smyth N, Pasztoi M, Buzas EI, Szipocs R, Kolonics A, Temesvari E, Karpati S. (2014) Reduced inflammatory threshold indicates skin barrier defect in transglutaminase 3 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 134: 105-111.
60. Jiang WG, Ablin RJ. (2011) Prostate transglutaminase: a unique transglutaminase and its role in prostate cancer. *Biomark Med*, 5: 285-291.
61. Jiang WG, Ye L, Sanders AJ, Ruge F, Kynaston HG, Ablin RJ, Mason MD. (2013) Prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) enhances the adhesion of prostate cancer cells to extracellular matrix, the potential role of TGase-core domain. *J Transl Med*, 11: 269.
62. Iismaa SE. (2016) The prostate-specific protein, transglutaminase 4 (TG4), is an autoantigen associated with male subfertility. *Ann Transl Med*, 4: S35.
63. Landegren N, Sharon D, Shum AK, Khan IS, Fasano KJ, Hallgren A, Kampf C, Freyhult E, Ardesjo-Lundgren B, Alimohammadi M, Rathsmann S, Ludvigsson JF, Lundh D, Motrich R, Rivero V, Fong L, Giwercman A, Gustafsson J, Perheentupa J, Husebye ES, Anderson MS, Snyder M, Kampe O. (2015) Transglutaminase 4 as a prostate autoantigen in male subfertility. *Sci Transl Med*, 7: 292ra101.
64. Dean MD. (2013) Genetic disruption of the copulatory plug in mice leads to severely reduced fertility. *PLoS Genet*, 9: e1003185.

65. Aeschlimann D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF. (1998) Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes. Detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Biol Chem*, 273: 3452-3460.
66. Candi E, Oddi S, Terrinoni A, Paradisi A, Ranalli M, Finazzi-Agro A, Melino G. (2001) Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro. *J Biol Chem*, 276: 35014-35023.
67. Candi E, Paradisi A, Terrinoni A, Pietroni V, Oddi S, Cadot B, Jogini V, Meiyappan M, Clardy J, Finazzi-Agro A, Melino G. (2004) Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides. *Biochem J*, 381: 313-319.
68. van der Velden JJ, van Geel M, Nellen RG, Jonkman MF, McGrath JA, Nanda A, Sprecher E, van Steensel MA, McLean WH, Cassidy AJ. (2015) Novel TGM5 mutations in acral peeling skin syndrome. *Exp Dermatol*, 24: 285-289.
69. Cassidy AJ, van Steensel MA, Steijlen PM, van Geel M, van der Velden J, Morley SM, Terrinoni A, Melino G, Candi E, McLean WH. (2005) A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet*, 77: 909-917.
70. Pigors M, Kiritsi D, Cobzaru C, Schwieger-Briel A, Suarez J, Faletra F, Aho H, Makela L, Kern JS, Bruckner-Tuderman L, Has C. (2012) TGM5 mutations impact epidermal differentiation in acral peeling skin syndrome. *J Invest Dermatol*, 132: 2422-2429.

71. Liu YT, Tang BS, Lan W, Song NN, Huang Y, Zhang L, Guan WJ, Shi YT, Shen L, Jiang H, Guo JF, Xia K, Ding YQ, Wang JL. (2013) Distribution of transglutaminase 6 in the central nervous system of adult mice. *Anat Rec (Hoboken)*, 296: 1576-1587.
72. Thomas H, Beck K, Adamczyk M, Aeschlimann P, Langley M, Oita RC, Thiebach L, Hils M, Aeschlimann D. (2013) Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino Acids*, 44: 161-177.
73. Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Strigun A, Sanders DS, Woodroffe N, Aeschlimann D. (2008) Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol*, 64: 332-343.
74. Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Sanders DS, Maki M, Kaukinen K, Grunewald RA, Bandmann O, Woodroffe N, Haddock G, Aeschlimann DP. (2013) Transglutaminase 6 antibodies in the diagnosis of gluten ataxia. *Neurology*, 80: 1740-1745.
75. Cascella NG, Santora D, Gregory P, Kelly DL, Fasano A, Eaton WW. (2013) Increased prevalence of transglutaminase 6 antibodies in sera from schizophrenia patients. *Schizophr Bull*, 39: 867-871.
76. Stenberg R, Hadjivassiliou M, Aeschlimann P, Hoggard N, Aeschlimann D. (2014) Anti-transglutaminase 6 antibodies in children and young adults with cerebral palsy. *Autoimmune Dis*, 2014: 237107.
77. Gadoth A, Nefussy B, Bleiberg M, Klein T, Artman I, Drory VE. (2015) Transglutaminase 6 Antibodies in the Serum of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol*, 72: 676-681.

78. Hadjivassiliou M, Sanders DS, Grunewald RA, Woodroffe N, Boscolo S, Aeschlimann D. (2010) Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet Neurol*, 9: 318-330.
79. Hadjivassiliou M, Duker AP, Sanders DS. (2014) Gluten-related neurologic dysfunction. *Handb Clin Neurol*, 120: 607-619.
80. Boscolo S, Lorenzon A, Sblattero D, Florian F, Stebel M, Marzari R, Not T, Aeschlimann D, Ventura A, Hadjivassiliou M, Tongiorgi E. (2010) Anti transglutaminase antibodies cause ataxia in mice. *PLoS One*, 5: e9698.
81. Wang JL, Yang X, Xia K, Hu ZM, Weng L, Jin X, Jiang H, Zhang P, Shen L, Guo JF, Li N, Li YR, Lei LF, Zhou J, Du J, Zhou YF, Pan Q, Wang J, Wang J, Li RQ, Tang BS. (2010) TGM6 identified as a novel causative gene of spinocerebellar ataxias using exome sequencing. *Brain*, 133: 3510-3518.
82. Kuramoto K, Yamasaki R, Shimizu Y, Tatsukawa H, Hitomi K. (2013) Phage-displayed peptide library screening for preferred human substrate peptide sequences for transglutaminase 7. *Arch Biochem Biophys*, 537: 138-143.
83. Lehtinen MJ, Meri S, Jokiranta TS. (2004) Interdomain contact regions and angles between adjacent short consensus repeat domains. *J Mol Biol*, 344: 1385-1396.
84. Lorand L, Losowsky MS, Miloszewski KJ. (1980) Human factor XIII: fibrin-stabilizing factor. *Prog Hemost Thromb*, 5: 245-290.
85. Bagoly Z, Katona E, Muszbek L. (2012) Factor XIII and inflammatory cells. *Thromb Res*, 129 Suppl 2: S77-81.
86. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. (2012) Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res*, 129: 382-387.

87. Puszkin EG, Raghuraman V. (1985) Catalytic properties of a calmodulin-regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard. *J Biol Chem*, 260: 16012-16020.
88. Adany R, Belkin A, Vasilevskaya T, Muszbek L. (1985) Identification of blood coagulation factor XIII in human peritoneal macrophages. *Eur J Cell Biol*, 38: 171-173.
89. Muszbek L, Adany R, Szegedi G, Polgar J, Kawai M. (1985) Factor XIII of blood coagulation in human monocytes. *Thromb Res*, 37: 401-410.
90. Nurminskaya M, Magee C, Faverman L, Linsenmayer TF. (2003) Chondrocyte-derived transglutaminase promotes maturation of preosteoblasts in periosteal bone. *Dev Biol*, 263: 139-152.
91. Nurminskaya MV, Recheis B, Nimpf J, Magee C, Linsenmayer TF. (2002) Transglutaminase factor XIII_A in the cartilage of developing avian long bones. *Dev Dyn*, 223: 24-32.
92. Torocsik D, Bardos H, Nagy L, Adany R. (2005) Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*, 62: 2132-2139.
93. Peters LL, Jindel HK, Gwynn B, Korsgren C, John KM, Lux SE, Mohandas N, Cohen CM, Cho MR, Golan DE, Brugnara C. (1999) Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4. 2-null mice. *J Clin Invest*, 103: 1527-1537.
94. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. (1953) Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*, 42: 34-42.

95. Marks J, Shuster S, Watson AJ. (1966) Small-bowel changes in dermatitis herpetiformis. *Lancet*, 2: 1280-1282.
96. Fry L, Keir P, McMinn RM, Cowan JD, Hoffbrand AV. (1967) Small-intestinal structure and function and haematological changes in dermatitis herpetiformis. *Lancet*, 2: 729-733.
97. Fry L, McMinn RM, Cowan JD, Hoffbrand AV. (1968) Effect of gluten-free diet on dermatological, intestinal, and haematological manifestations of dermatitis herpetiformis. *Lancet*, 1: 557-561.
98. Fry L, Seah PP, Riches DJ, Hoffbrand AV. (1973) Clearance of skin lesions in dermatitis herpetiformis after gluten withdrawal. *Lancet*, 1: 288-291.
99. Reunala T, Blomqvist K, Tarpila S, Halme H, Kangas K. (1977) Gluten-free diet in dermatitis herpetiformis. I. Clinical response of skin lesions in 81 patients. *Br J Dermatol*, 97: 473-480.
100. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP. (2012) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 54: 136-160.
101. Holmes G. (2013) Non coeliac gluten sensitivity. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 6: 115-119.
102. Karpati S. (2012) Dermatitis herpetiformis. *Clin Dermatol*, 30: 56-59.
103. Marks R, Jones EW. (1971) Purpura in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 84: 386-388.

104. Karpati S, Torok E, Kosnai I. (1986) Discrete palmar and plantar symptoms in children with dermatitis herpetiformis Duhring. *Cutis*, 37: 184-187.
105. Tu H, Parmentier L, Stieger M, Spanou Z, Horn M, Beltraminelli H, Borradori L. (2013) Acral purpura as leading clinical manifestation of dermatitis herpetiformis: report of two adult cases with a review of the literature. *Dermatology*, 227: 1-4.
106. Hofmann SC, Nashan D, Bruckner-Tuderman L. (2009) Petechiae on the fingertips as presenting symptom of dermatitis herpetiformis Duhring. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23: 732-733.
107. Paek SY, Steinberg SM, Katz SI. (2011) Remission in dermatitis herpetiformis: a cohort study. *Arch Dermatol*, 147: 301-305.
108. Mobacken H, Andersson H, Dahlberg E, Fransson K, Gillberg R, Kastrup W, Stockbrugger R. (1986) Spontaneous remission of dermatitis herpetiformis: dietary and gastrointestinal studies. *Acta Derm Venereol*, 66: 245-250.
109. Karpati S. (2012) An exception within the group of autoimmune blistering diseases: dermatitis herpetiformis, the gluten-sensitive dermopathy. *Immunol Allergy Clin North Am*, 32: 255-262.
110. Mansikka E, Hervonen K, Salmi TT, Kautiainen H, Kaukinen K, Collin P, Reunala T. (2017) The Decreasing Prevalence of Severe Villous Atrophy in Dermatitis Herpetiformis: A 45-Year Experience in 393 Patients. *J Clin Gastroenterol*, 51: 235-239.
111. Dube C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D, Moher D. (2005) The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*, 128: S57-67.

112. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, Murray L, Metzger MH, Gasparin M, Bravi E, Maki M. (2010) The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*, 42: 587-595.
113. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. (2012) Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*, 18: 6036-6059.
114. Catassi C, Gatti S, Fasano A. (2014) The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 59 Suppl 1: S7-9.
115. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K. (2015) Dermatitis herpetiformis: pathognomonic transglutaminase IgA deposits in the skin and excellent prognosis on a gluten-free diet. *Acta Derm Venereol*, 95: 917-922.
116. Lemberg D, Day AS, Bohane T. (2005) Coeliac disease presenting as dermatitis herpetiformis in infancy. *J Paediatr Child Health*, 41: 294-296.
117. Gawkrödger DJ, Blackwell JN, Gilmour HM, Rifkind EA, Heading RC, Barnetson RS. (1984) Dermatitis herpetiformis: diagnosis, diet and demography. *Gut*, 25: 151-157.
118. Collin P, Salmi TT, Hervonen K, Kaukinen K, Reunala T. (2017) Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease. *Ann Med*, 49: 23-31.
119. Salmi TT, Hervonen K, Kautiainen H, Collin P, Reunala T. (2011) Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40-year prospective study from Finland. *Br J Dermatol*, 165: 354-359.
120. Mooney PD, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Coeliac disease. (2014) *Bmj*, 348: g1561.

121. Kocsis D, Miheller P, Lorinczy K, Herszenyi L, Tulassay Z, Racz K, Juhasz M. (2013) Coeliac disease in a 15-year period of observation (1997 and 2011) in a Hungarian referral centre. *Eur J Intern Med*, 24: 461-467.
122. Hervonen K, Salmi TT, Kurppa K, Kaukinen K, Collin P, Reunala T. (2014) Dermatitis herpetiformis in children: a long-term follow-up study. *Br J Dermatol*, 171: 1242-1243.
123. Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Czinner A, Goracz G, Vamos A, Szabo T. (1999) High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 28: 26-30.
124. Korponay-Szabo IR, Szabados K, Pusztai J, Uhrin K, Ludmany E, Nemes E, Kaukinen K, Kapitany A, Koskinen L, Sipka S, Imre A, Maki M. (2007) Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study. *Bmj*, 335: 1244-1247.
125. Sardy M, Kornsee Z, Kelemen D, Papp S, Medvecz M, Karpati S. (2013) Celiac disease screening among healthy blood donors in Hungary. *Z Gastroenterol*, 51: 1235-1239.
126. West J, Fleming KM, Tata LJ, Card TR, Crooks CJ. (2014) Incidence and prevalence of celiac disease and dermatitis herpetiformis in the UK over two decades: population-based study. *Am J Gastroenterol*, 109: 757-768.
127. Smith JB, Tulloch JE, Meyer LJ, Zone JJ. (1992) The incidence and prevalence of dermatitis herpetiformis in Utah. *Arch Dermatol*, 128: 1608-1610.

128. Clarindo MV, Possebon AT, Soligo EM, Uyeda H, Ruaro RT, Empinotti JC. (2014) Dermatitis herpetiformis: pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and treatment. *An Bras Dermatol*, 89: 865-875; quiz 876-867.
129. Ohata C, Ishii N, Hamada T, Shimomura Y, Niizeki H, Dainichi T, Furumura M, Tsuruta D, Hashimoto T. (2012) Distinct characteristics in Japanese dermatitis herpetiformis: a review of all 91 Japanese patients over the last 35 years. *Clin Dev Immunol*, 2012: 562168.
130. Zhang F, Yang B, Lin Y, Chen S, Zhou G, Wang G, Chen X, Zhang Y, Tian H, Yu M, Shi Z, Zhang D. (2012) Dermatitis herpetiformis in China: a report of 22 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26: 903-907.
131. Milinkovic MV, Jankovic S, Medenica L, Nikolic M, Reljic V, Popadic S, Jankovic J. (2016) Incidence of autoimmune bullous diseases in Serbia: a 20-year retrospective study. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14: 995-1005.
132. Karpati S, Meurer M, Stolz W, Schrallhammer K, Krieg T, Braun-Falco O. (1990) Dermatitis herpetiformis bodies. Ultrastructural study on the skin of patients using direct preembedding immunogold labeling. *Arch Dermatol*, 126: 1469-1474.
133. Dick HM, Fraser NG, Murray D. (1969) Immunofluorescent antibody studies in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 81: 692-696.
134. Eterman KP, Nefkens MJ, van der Meer JB. (1977) Failure to detect specific gluten antigens associated with the immune aggregates in the skin in dermatitis herpetiformis. *Arch Dermatol Res*, 260: 247-252.
135. Hervonen K, Hakanen M, Kaukinen K, Collin P, Reunala T. (2002) First-degree relatives are frequently affected in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Scand J Gastroenterol*, 37: 51-55.

136. Reunala T. (1996) Incidence of familial dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 134: 394-398.
137. Balas A, Vicario JL, Zambrano A, Acuna D, Garcia-Novo D. (1997) Absolute linkage of celiac disease and dermatitis herpetiformis to HLA-DQ. *Tissue Antigens*, 50: 52-56.
138. Spurkland A, Ingvarsson G, Falk ES, Knutsen I, Sollid LM, Thorsby E. (1997) Dermatitis herpetiformis and celiac disease are both primarily associated with the HLA-DQ (alpha 1*0501, beta 1*02) or the HLA-DQ (alpha 1*03, beta 1*0302) heterodimers. *Tissue Antigens*, 49: 29-34.
139. Dezsofi A, Szebeni B, Hermann CS, Kapitany A, Veres G, Sipka S, Korner A, Madacsy L, Korponay-Szabo I, Rajczy K, Arato A. (2008) Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 47: 283-287.
140. Sharma A, Liu X, Hadley D, Hagopian W, Liu E, Chen WM, Onengut-Gumuscu S, Simell V, Rewers M, Ziegler AG, Lernmark A, Simell O, Toppari J, Krischer JP, Akolkar B, Rich SS, Agardh D, She JX. (2016) Identification of Non-HLA Genes Associated with Celiac Disease and Country-Specific Differences in a Large, International Pediatric Cohort. *PLoS One*, 11: e0152476.
141. Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, Paparo F, D'Alfonso S, Giordano M, Sferlazzas C, Magazzu G, Momigliano-Richiardi P, Greco L, Stazi MA. (2006) Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*, 55: 803-808.
142. Kosnai I, Karpati S, Torok E, Bucsky P, Gyodi E. (1985) Dermatitis herpetiformis in monozygous twins: discordance for dermatitis herpetiformis and concordance for gluten-sensitive enteropathy. *Eur J Pediatr*, 144: 404-405.

143. Hervonen K, Karell K, Holopainen P, Collin P, Partanen J, Reunala T. (2000) Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *J Invest Dermatol*, 115: 990-993.
144. Zhang Y, Luo G, Liu D, Wang D, Yang W, Sun J, Zhang A, Zhan K. (2015) Genome-, Transcriptome- and Proteome-Wide Analyses of the Gliadin Gene Families in *Triticum urartu*. *PLoS One*, 10: e0131559.
145. Rewers M. (2005) Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology*, 128: S47-51.
146. Mardini HE, Westgate P, Grigorian AY. (2015) Racial Differences in the Prevalence of Celiac Disease in the US Population: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009-2012. *Dig Dis Sci*, 60: 1738-1742.
147. Stammaes J, Sollid LM. (2015) Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. *Semin Immunol*, 27: 343-352.
148. Korponay-Szabo IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Kiraly R, Kovacs JB, Fesus L, Maki M. (2004) In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*, 53: 641-648.
149. Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. (2015) Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12: 497-506.
150. Karpati S, Burgin-Wolff A, Krieg T, Meurer M, Stolz W, Braun-Falco O. (1990) Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with coeliac disease. *Lancet*, 336: 1335-1338.

151. Kaukinen K, Collin P, Laurila K, Kaartinen T, Partanen J, Maki M. (2007) Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand J Gastroenterol*, 42: 1428-1433.
152. Seah PP, Fry L, Hoffbrand AV, Holborow EJ. (1971) Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult coeliac disease. *Lancet*, 1: 834-836.
153. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. (1983) IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci*, 420: 325-334.
154. Chorzelski TP, Rosinska D, Beutner EH, Sulej J, Kumar V. (1988) Aggressive gluten challenge of dermatitis herpetiformis cases converts them from seronegative to seropositive for IgA-class endomysial antibodies. *J Am Acad Dermatol*, 18: 672-678.
155. Hallstrom O. (1989) Comparison of IgA-class reticulin and endomysium antibodies in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut*, 30: 1225-1232.
156. Karpati S, Kosnai I, Torok E, Kovacs JB. (1988) Immunoglobulin A deposition in jejunal mucosa of children with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*, 91: 336-339.
157. Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Karpati S, Zagoni T, Riecken EO, Schuppan D. (1999) Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*, 113: 133-136.
158. Sardy M, Odenthal U, Karpati S, Paulsson M, Smyth N. (1999) Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clin Chem*, 45: 2142-2149.

159. Korponay-Szabo IR, Laurila K, Szondy Z, Halttunen T, Szalai Z, Dahlbom I, Rantala I, Kovacs JB, Fesus L, Maki M. (2003) Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut*, 52: 199-204.
160. Salmi TT, Hervonen K, Laurila K, Collin P, Maki M, Koskinen O, Huhtala H, Kaukinen K, Reunala T. (2014) Small bowel transglutaminase 2-specific IgA deposits in dermatitis herpetiformis. *Acta Derm Venereol*, 94: 393-397.
161. Egelrud T, Back O. (1985) Dermatitis herpetiformis: biochemical properties of the granular deposits of IgA in papillary dermis. Characterization of SDS-soluble IgA-like material and potentially antigen-binding IgA fragments released by pepsin. *J Invest Dermatol*, 84: 239-245.
162. Donaldson MR, Zone JJ, Schmidt LA, Taylor TB, Neuhausen SL, Hull CM, Meyer LJ. (2007) Epidermal transglutaminase deposits in perilesional and uninvolved skin in patients with dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*, 127: 1268-1271.
163. Fry L, Haffenden G, Wojnarowska F, Thompson BR, Seah PP. (1978) IgA and C3 complement in the uninvolved skin in dermatitis herpetiformis after gluten withdrawal. *Br J Dermatol*, 99: 31-37.
164. Garioch JJ, Lewis HM, Sargent SA, Leonard JN, Fry L. (1994) 25 years' experience of a gluten-free diet in the treatment of dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 131: 541-545.
165. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K, Laurila K, Kautiainen H, Collin P, Kaukinen K. (2015) IgA antiepidermal transglutaminase antibodies in dermatitis herpetiformis: a significant but not complete response to a gluten-free diet treatment. *Br J Dermatol*, 172: 1139-1141.

166. Taylor TB, Schmidt LA, Meyer LJ, Zone JJ. (2015) Transglutaminase 3 present in the IgA aggregates in dermatitis herpetiformis skin is enzymatically active and binds soluble fibrinogen. *J Invest Dermatol*, 135: 623-625.
167. Jaskowski TD, Hamblin T, Wilson AR, Hill HR, Book LS, Meyer LJ, Zone JJ, Hull CM. (2009) IgA anti-epidermal transglutaminase antibodies in dermatitis herpetiformis and pediatric celiac disease. *J Invest Dermatol*, 129: 2728-2730.
168. Heil PM, Volc-Platzer B, Karlhofer F, Gebhart W, Huber WD, Benesch T, Vogelsang H, Stingl G. (2005) Transglutaminases as diagnostically relevant autoantigens in patients with gluten sensitivity. *J Dtsch Dermatol Ges*, 3: 974-978.
169. Rose C, Armbruster FP, Ruppert J, Igl BW, Zillikens D, Shimanovich I. (2009) Autoantibodies against epidermal transglutaminase are a sensitive diagnostic marker in patients with dermatitis herpetiformis on a normal or gluten-free diet. *J Am Acad Dermatol*, 61: 39-43.
170. Borroni G, Biagi F, Ciocca O, Vassallo C, Carugno A, Cananzi R, Campanella J, Bianchi PI, Brazzelli V, Corazza GR. (2013) IgA anti-epidermal transglutaminase autoantibodies: a sensible and sensitive marker for diagnosis of dermatitis herpetiformis in adult patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27: 836-841.
171. Salmi TT, Kurppa K, Hervonen K, Laurila K, Collin P, Huhtala H, Saavalainen P, Sievanen H, Reunala T, Kaukinen K. (2016) Serum transglutaminase 3 antibodies correlate with age at celiac disease diagnosis. *Dig Liver Dis*, 48: 632-637.
172. Hull CM, Liddle M, Hansen N, Meyer LJ, Schmidt L, Taylor T, Jaskowski TD, Hill HR, Zone JJ. (2008) Elevation of IgA anti-epidermal transglutaminase antibodies in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 159: 120-124.

173. Ress K, Teesalu K, Annus T, Putnik U, Lepik K, Luts K, Uibo O, Uibo R. (2014) Low prevalence of IgA anti-transglutaminase 1, 2, and 3 autoantibodies in children with atopic dermatitis. *BMC Res Notes*, 7: 310.
174. Barnadas MA. (2016) Dermatitis Herpetiformis: A Review of Direct Immunofluorescence Findings. *Am J Dermatopathol*, 38: 283-288.
175. Warren SJ, Cockerell CJ. (2002) Characterization of a subgroup of patients with dermatitis herpetiformis with nonclassical histologic features. *Am J Dermatopathol*, 24: 305-308.
176. Samolitis NJ, Hull CM, Leiferman KM, Zone JJ. (2006) Dermatitis herpetiformis and partial IgA deficiency. *J Am Acad Dermatol*, 54: S206-209.
177. Marsh MN. (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 102: 330-354.
178. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. (1999) The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11: 1185-1194.
179. Oberhuber G, Caspary WF, Kirchner T, Borchard F, Stolte M. (2001) [Study Group of Gastroenterological Pathology of the German Society of Pathology. Recommendations for celiac disease/sprue diagnosis]. *Z Gastroenterol*, 39: 157-166.
180. Jarvinen TT, Kaukinen K, Laurila K, Kyronpalo S, Rasmussen M, Maki M, Korhonen H, Reunala T, Collin P. (2003) Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol*, 98: 1332-1337.

181. Juhasz M, Zagoni T, Toth M, Tulassay Z. (2000) A coeliakia napjainkban: a bővülő ismeretek áttekintése. *Orv Hetil*, 141: 2583-2593.
182. Hardman CM, Garioch JJ, Leonard JN, Thomas HJ, Walker MM, Lortan JE, Lister A, Fry L. (1997) Absence of toxicity of oats in patients with dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med*, 337: 1884-1887.
183. Reunala T, Collin P, Holm K, Pikkarainen P, Miettinen A, Vuolteenaho N, Maki M. (1998) Tolerance to oats in dermatitis herpetiformis. *Gut*, 43: 490-493.
184. Leonard J, Haffenden G, Tucker W, Unsworth J, Swain F, McMinn R, Holborow J, Fry L. (1983) Gluten challenge in dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med*, 308: 816-819.
185. Hervonen K, Alakoski A, Salmi TT, Helakorpi S, Kautiainen H, Kaukinen K, Pukkala E, Collin P, Reunala T. (2012) Reduced mortality in dermatitis herpetiformis: a population-based study of 476 patients. *Br J Dermatol*, 167: 1331-1337.
186. Bardella MT, Fredella C, Trovato C, Ermacora E, Cavalli R, Saladino V, Prampolini L. (2003) Long-term remission in patients with dermatitis herpetiformis on a normal diet. *Br J Dermatol*, 149: 968-971.
187. Hervonen K, Salmi TT, Ilus T, Paasikivi K, Vornanen M, Laurila K, Lindfors K, Viiri K, Saavalainen P, Collin P, Kaukinen K, Reunala T. (2016) Dermatitis Herpetiformis Refractory to Gluten-free Dietary Treatment. *Acta Derm Venereol*, 96: 82-86.
188. Rubio-Tapia A, Murray JA. (2010) Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*, 59: 547-557.

189. Sener O, Doganci L, Safali M, Besirbellioglu B, Bulucu F, Pahsa A. (2006) Severe dapsone hypersensitivity syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 16: 268-270.
190. Lorenz M, Wozel G, Schmitt J. (2012) Hypersensitivity reactions to dapsone: a systematic review. *Acta Derm Venereol*, 92: 194-199.
191. Wozel G, Blasum C. (2014) Dapsone in dermatology and beyond. *Arch Dermatol Res*, 306: 103-124.
192. Caproni M, Antiga E, Melani L, Fabbri P. (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 23: 633-638.
193. Hall RP, Lawley TJ, Heck JA, Katz SI. (1980) IgA-containing circulating immune complexes in dermatitis herpetiformis, Henoch-Schonlein purpura, systemic lupus erythematosus and other diseases. *Clin Exp Immunol*, 40: 431-437.
194. van der Meer JB. (1990) Gluten-free diet and elemental diet in dermatitis herpetiformis. *Int J Dermatol*, 29: 679-692.
195. Karpati S. (2004) Dermatitis herpetiformis: close to unravelling a disease. *J Dermatol Sci*, 34: 83-90.
196. Preisz K, Sardy M, Horvath A, Karpati S. (2005) Immunoglobulin, complement and epidermal transglutaminase deposition in the cutaneous vessels in dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 19: 74-79.
197. Reunala T, Helin H, Pasternack A, Linder E, Kalimo K. (1983) Renal involvement and circulating immune complexes in dermatitis herpetiformis. *J Am Acad Dermatol*, 9: 219-223.

198. Helin H, Mustonen J, Reunala T, Pasternack A. (1983) IgA nephropathy associated with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Arch Pathol Lab Med*, 107: 324-327.
199. Lawley TJ, Hall RP, Fauci AS, Katz SI, Hamburger MI, Frank MM. (1981) Defective Fc-receptor functions associated with the HLA-B8/DRw3 haplotype: studies in patients with dermatitis herpetiformis and normal subjects. *N Engl J Med*, 304: 185-192.
200. Zone JJ, Schmidt LA, Taylor TB, Hull CM, Sotiriou MC, Jaskowski TD, Hill HR, Meyer LJ. (2011) Dermatitis herpetiformis sera or goat anti-transglutaminase-3 transferred to human skin-grafted mice mimics dermatitis herpetiformis immunopathology. *J Immunol*, 186: 4474-4480.
201. Mustakallio KK, Blomqvist K, Salo OP. (1970) Papillary fibrin in dermatitis herpetiformis. *Arch Belg Dermatol Syphiligr*, 26: 441-447.
202. Salo OP, Laiho K, Blomqvist K, Mustakallio KK. (1970) Papillary deposition of fibrin in iodide reactions in dermatitis herpetiformis. *Ann Clin Res*, 2: 19-21.
203. Jakubowicz K, Dabrowski J, Maciejewski W. (1971) Deposition of fibrin-like material in early lesions of dermatitis herpetiformis. *Ann Clin Res*, 3: 34-38.
204. Reitamo S, Reunala T, Kontinen YT, Saksela O, Salo OP. (1981) Inflammatory cells, IgA, C3, fibrin and fibronectin in skin lesions in dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 105: 167-177.
205. Zaghi D, Witheiler D, Menter AM. (2014) Petechial eruption on fingers. Dermatitis herpetiformis. *JAMA Dermatol*, 150: 1353-1354.
206. Bogнар P, Gorog A, Karpati S. (2016) High prevalence of cryofibrinogenaemia in dermatitis herpetiformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 30: 517-518.

207. Karpati S SM, Marschalko M, Horvath A. (1997) New clinical approach in treatment of cryofibrinogenemia – diamino-diphenyl-sulfone seems to decrease the amount of cold precipitated serum-proteins-in vitro. *J Invest Dermatol*, 109: 463.
208. Cox NH, Friedmann PS. (1991) Induction of lesions of dermatitis herpetiformis by autologous serum. *Br J Dermatol*, 124: 69-73.
209. Alexander JO. (1963) The treatment of dermatitis herpetiformis with heparin. *Br J Dermatol*, 75: 289-293.
210. Tan CC, Sale JE, Brammer C, Irons RP, Freeman JG. (1996) A rare case of dermatitis herpetiformis requiring parenteral heparin for long-term control. *Dermatology*, 192: 185-186.
211. Shah SA, Ormerod AD. (2000) Dermatitis herpetiformis effectively treated with heparin, tetracycline and nicotinamide. *Clin Exp Dermatol*, 25: 204-205.
212. Longstaff C, Kolev K. (2015) Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*, 13 Suppl 1: S98-105.
213. Kolev K, Longstaff C, Machovich R. (2005) Fibrinolysis at the fluid-solid interface of thrombi. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*, 3: 341-355.
214. Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabo L, Kolev K. (2011) The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. *Blood*, 117: 661-668.
215. Longstaff C, Varju I, Sotonyi P, Szabo L, Krumrey M, Hoell A, Bota A, Varga Z, Komorowicz E, Kolev K. (2013) Mechanical stability and fibrinolytic

resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J Biol Chem*, 288: 6946-6956.

216. Kolev K, Gombas J, Varadi B, Skopal J, Mede K, Pitlik E, Nagy Z, Machovich R. (2002) Immunoglobulin G from patients with antiphospholipid syndrome impairs the fibrin dissolution with plasmin. *Thromb Haemost*, 87: 502-508.
217. Carr ME, Gabriel DA. (1980) The effect of dextran 70 on the structure of plasma-derived fibrin gels. *J Lab Clin Med*, 96: 985-993.
218. Jones AJ, Meunier AM. (1990) A precise and rapid microtitre plate clot lysis assay: methodology, kinetic modeling and measurement of catalytic constants for plasminogen activation during fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 64: 455-463.
219. Carr ME, Jr., Powers PL, Jones MR. (1991) Effects of poloxamer 188 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. *Thromb Haemost*, 66: 565-568.
220. Nishino N, Kakkar VV, Scully MF. (1991) Influence of intrinsic and extrinsic plasminogen upon the lysis of thrombi in vitro. *Thromb Haemost*, 66: 672-677.
221. Carr ME, Jr., Krishnamurti C, Alving BM. (1992) Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis. *Thromb Haemost*, 67: 106-110.
222. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. (1994) Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res*, 75: 521-538.
223. Carr ME, Jr., Dent RM, Carr SL. (1996) Abnormal fibrin structure and inhibition of fibrinolysis in patients with multiple myeloma. *J Lab Clin Med*, 128: 83-88.

224. Zuidema J, Hilbers-Modderman ES, Merkus FW. (1986) Clinical pharmacokinetics of dapsone. *Clin Pharmacokinet*, 11: 299-315.
225. N.D. Nikolova DT-Z, K. Kolev, K. Tenekedjiev. (2013) Monte Carlo statistical tests for identity of theoretical and empirical distributions of experimental data. Chan WK, ed *Theory and Applications of Monte Carlo Simulations* Rijeka, Croatia, 1-26.
226. Zone JJ, LaSalle BA, Provost TT. (1980) Circulating immune complexes of IgA type in dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*, 75: 152-155.
227. Mohammed I, Holborow EJ, Fry L, Thompson BR, Hoffbrand AV, Stewart JS. (1976) Multiple immune complexes and hypocomplementaemia in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Lancet*, 1: 487-490.
228. Kemp M, Husby S, Larsen ML, Svehaug SE. (1988) ELISA analysis of IgA subclass antibodies to dietary antigens. Elevated IgA1 antibodies in children with coeliac disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 87: 247-253.
229. Barnes RM, Lewis-Jones MS. (1989) Isotype distribution and serial levels of antibodies reactive with dietary protein antigens in dermatitis herpetiformis. *J Clin Lab Immunol*, 30: 87-91.
230. Ferrari S, Palavra K, Gruber B, Kremer Hovinga JA, Knobl P, Caron C, Cromwell C, Aledort L, Plaimauer B, Turecek PL, Rottensteiner H, Scheiflinger F. (2014) Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 99: 779-787.
231. Stammaes J, Dorum S, Fleckenstein B, Aeschlimann D, Sollid LM. (2010) Gluten T cell epitope targeting by TG3 and TG6; implications for dermatitis herpetiformis and gluten ataxia. *Amino Acids*, 39: 1183-1191.

232. Huelsz-Prince G, Belkin AM, VanBavel E, Bakker EN. (2013) Activation of extracellular transglutaminase 2 by mechanical force in the arterial wall. *J Vasc Res*, 50: 383-395.
233. Garioch JJ, Baker BS, Leonard JN, Fry L. (1994) T lymphocytes in lesional skin of patients with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 131: 822-826.
234. Salmi TT, Hervonen K, Kurppa K, Collin P, Kaukinen K, Reunala T. (2015) Celiac disease evolving into dermatitis herpetiformis in patients adhering to normal or gluten-free diet. *Scand J Gastroenterol*, 50: 387-392.
235. Varju I, Longstaff C, Szabo L, Farkas AZ, Varga-Szabo VJ, Tanka-Salamon A, Machovich R, Kolev K. (2015) DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment. *Thromb Haemost*, 113: 1289-1298.
236. Talens S, Leebeek FW, Demmers JA, Rijken DC. (2012) Identification of fibrin clot-bound plasma proteins. *PLoS One*, 7: e41966.
237. Karpati S SM, Marschalko M, Horvath A. (1997) New clinical approach in treatment of cryofibrinogenemia - diamino-diphenyl-sulfone seems to decrease the amount of cold precipitated serum-proteins-in vitro. *J Invest Dermatol*, 109: 463.
238. Goeser MR, Laniosz V, Wetter DA. (2014) A practical approach to the diagnosis, evaluation, and management of cutaneous small-vessel vasculitis. *Am J Clin Dermatol*, 15: 299-306.
239. Marzano AV, Tedeschi A, Polloni I, Crosti C, Cugno M. (2013) Prothrombotic state and impaired fibrinolysis in bullous pemphigoid, the most frequent autoimmune blistering disease. *Clin Exp Immunol*, 171: 76-81.

240. Wankiewicz A, Iwan-Zietek I, Kotschy M, Gwiedzinski Z. (2002) Selected parameters of fibrinolysis system in patients with dermatitis herpetiformis. *Med Sci Monit*, 8: Cr189-192.
241. Airola K, Vaalamo M, Reunala T, Saarialho-Kere UK. (1995) Enhanced expression of interstitial collagenase, stromelysin-1, and urokinase plasminogen activator in lesions of dermatitis herpetiformis. *J Invest Dermatol*, 105: 184-189.
242. Kolev ZRK. (2011) Matrix metalloproteinases at key junctions in the pathomechanism of stroke. *Open Life Sciences*, 6.

11. Saját közlemények

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Görög A, Németh K, Kolev K, Zone JJ, Mayer B, Silló P, Bognár P, Kárpáti S. (2016) Circulating Transglutaminase 3-Immunoglobulin A Immune Complexes in Dermatitis Herpetiformis. *J Invest Dermatol.* 136: 1729-1731.

IF:6,915

Görög A, Németh K, Szabó L, Mayer B, Silló P, Kolev K, Kárpáti S. (2016) Decreased fibrinolytic potential and morphological changes of fibrin structure in dermatitis herpetiformis. *J Dermatol Sci.* 84: 17-23.

IF:3,739

11.2. A disszertációtól független publikációk

Tukaj S, **Görög A**, Kleszczyński K, Zillikens D, Kárpáti S, Kasperkiewicz M. (2016) Autoimmunity to heat shock proteins and vitamin D status in patients with celiac disease without associated dermatitis herpetiformis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.10.002. [Epub ahead of print]

IF:3,985

Kasperkiewicz M, Tukaj S, Gembicki AJ, Silló P, **Görög A**, Zillikens D, Kárpáti S. (2014) Evidence for a role of autoantibodies to heat shock protein 60, 70, and 90 in patients with dermatitis herpetiformis. *Cell Stress Chaperones*, 19: 837-843.

IF:3,163

Orbán Annamária, **Görög Anna**, Silló Pálma, Kuroli Enikő, Hársing Judit, Kárpáti Sarolta. (2014) Gyermekkori lichen sclerosus et atrophicus, alopecia totalis és autoimmun thyreoiditis együttes előfordulása. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle.* 90: 55-59.

12. Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kárpáti Sarolta Professzor Asszonynak a szakmai iránymutatásáért, a munkám során nyújtott támogatásért és biztatásért.

Köszönöm Dr. Sárdy Miklós Igazgató Úrnak a DH patomechanizmusában végzett értékes kutatásait, valamint köszönöm, hogy az értekezés megírásához a körülményeket biztosította.

Őszinte hálával és köszönettel tartozom Dr. Kolev Krasimir professzor úrnak a fibrinolízis vizsgálatok során nyújtott iránymutatásért, segítségért és hasznos tanácsaiért. Köszönöm, hogy bármikor bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönöm Dr. Machovich Raymund Professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosított a SE Orvosi Biokémiai Intézettel való együttműködésre.

Köszönöm Dr. Soós Gyöngyvér Professzor Asszonynak a dapson beszerzése és a kísérlet megtervezése során nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Németh Krisztiánnak az ELISA vizsgálat kidolgozásában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Mayer Balázsnak, Mazán Mercédesznek, Pintér Dórának az ELISA vizsgálatoknál nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Dr. Szabó Lászlónak, a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjának Anyag- és Környezetkémiai Intézetében végzett elektronmikroszkópos vizsgálatokért és Zsolt J. John Professzor Úrnak az ELISA vizsgálatokhoz biztosított TG3 ellenanyagért.

Köszönöm Szigetvári Csillának és az Immunfluoreszcens Laboratórium valamennyi munkatársának a minták feldolgozását és leletezését.

Köszönöm Oravecz Györgyinek a fibrinolízis vizsgálatok során nyújtott szakmai segítségét és Bálint Krisztiánnak a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek kiértékelésénél nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Hársing Judit adjunktus asszonynak és Dr. Kuroli Enikőnek a szövettani metszetek leletezéséért és a szövettani fotó elkészítéséért.

Köszönöm szépen Dr. Hidvégi Bernadett és Dr. Medvecz Márta adjunktus asszonyoknak, Dr. Silló Pálmának, Dr. Szakonyi József főorvos úrnak, és valamennyi kollégámnak, akik betegeiket hozzám irányították, ezzel a munkámat segítették.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán valamennyi kollégámnak, aki munkámat valamilyen formában segítette.

Köszönöm a pácienseknek, hogy beleegyeztek a vizsgálatokba.

Végül szeretném megköszönni a családomnak a szeretetüket, támogatásukat és biztatásukat.

A dolgozat az OTKA 112612 és NN114460 számú pályázata és a Nékám Alapítvány támogatásával készült.